
MAISSIN YHDISTETTY BIOETANOLI- JA BIOKAASUTUOTANTO



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma
Visamäki, työn hyväksymispäivä

Mölsä Panu



VISAMÄKI

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma
Ympäristöbiotekniikka

Tekijä

Panu Mölsä

Vuosi 2012**Työn nimi**

Maissin yhdistetty bioetanoli- ja biokaasutuotanto

TIIVISTELMÄ

EU:n tavoitteena on päästä uusiutuvista energianlähteistä tehtyjen liikennebiopolttoaineiden käytössä 10 %:n tasolle vuoteen 2020 mennessä. Suomi on kuitenkin asettanut kansalliseksi tavoitteeksi 20 %:n tason vuoteen 2020 mennessä. Tällä hetkellä merkittävimmät liikennebiopolttoaineet ovat bioetanoli ja biodiesel, ja potentiaalisena liikennebiopolttoaineena voidaan pitää biokaasusta jalostettua biometaania.

Tämän työn keskeisinä tavoitteina oli selvittää rehmaissin, sisältäen koko maissin kasvibiomassan, soveltuvuutta yhdistettyyn bioetanoli- ja biokaasutus-käsittelyyn sekä verrata säilömismenetelmien vaikutusta raaka-aineeseen ja tuottoihin. Lisäksi tarkasteltiin bioetanolintuottovaiheen vaikutusta sen jälkeisen biokaasutuksen metaanintuottoihin. Opinnäytetyön kokeellinen osio suoritettiin HAMK:n tiloissa Hämeenlinnassa ja Helsingin yliopiston tiloissa Viikissä keväällä ja kesällä 2011.

Työn kirjallisuusosiossa käsitellään maissin säilöntää ja lignoselluloosapiitoisen materiaalin hajoamista liittyen bioetanoli- ja biokaasutuotantoon. Työn kokeellisessa osiossa eri tavoin säilötyistä maisseista tuotettiin bioetanolia ja metaania laboratoriotason koelaitteistolla. Etanolin (EtOH) määrä laskettiin sekä fermentointipullojen punnitustuloksista, että kulutettujen sokereiden määrityksellä. Tuotetun metaanin määrä rekisteröityi koesysteemistä automaattisesti.

Tuoreen- ja muurahaishapolla säilötyn (8 kk) maissin EtOH-tuotot olivat hyvin vastaavia, kun taas luonnollisesti säilötyn (8 kk) maissin EtOH-tuotto jäi vain puoleen em. tuotoista. Tämä selittyy luonnollisen säilönnän aikana tapahtuvasta sokerien happokäymisestä, mikä johtaa pienempään sokereiden määrään fermentoinnissa. Tällä ei kuitenkaan ollut vaikutusta metaanintuottoon. Sen sijaan EtOH-fermentointi paransi metaanintuottoa, sillä metaanintuotto oli suurempi fermentoidun orgaanisen aineen osalta kuin EtOH-vaiheen syötteillä. Suurin kokonaisenergiantuotto yhdistetyssä bioetanoli- ja biokaasutuotossa saavutettiin muurahaishapolla säilötyllä maissilla.

Avainsanat Biokaasu, metaani, bioetanoli, maissi, säilöntä**Sivut**

38 s, + liitteet 3 s.

VISAMAKI

Degree Programme in Biotechnology- and Food Engineering
Environmental Biotechnology

Author

Panu Mölsä

Year 2012

Subject of Bachelor's thesis Combined bioethanol and biogas production from maize

ABSTRACT

The EU's objective is to get energy from renewable sources for traffic up to 10 % by the year 2020. Finland has the national goal of 20 % by the year 2020. Currently, the most significant traffic biofuels are bioethanol and biodiesel. The one that can be considered also as a potential biofuel is biogas.


The main objective of this work was to study the suitability of forage maize (silage), including the entire corn plant biomass, for the combined bioethanol and biogas production and to compare what are the effects of preservation on raw material and production. Also the effects of bioethanol fermentation process on biogas production were studied. Experimental part of this thesis was carried out at the HAMK's premises in Hämeenlinna and Helsinki University's premises in Viikki during spring and summer 2011.

The literature deals with preservation and degradation of maize and other materials that contain lignocelluloses. In the experimental part, maize that were preserved in different ways, were tested for bioethanol and methane production with laboratory test equipments. Ethanol (EtOH) yield was calculated by weighing the fermentation bottles and by the determination of the reduced sugars during fermentation. The amount of produced methane was registered automatically.

The maize that was fresh and the one that was preserved with formic acid (8 months) had the EtOH yield very similar to each other, while the naturally preserved (8 months) maize had the EtOH yield only half of those. This can be explained by the natural preservation, which results in a lower amount of sugars in the maize. However, this had no effect on methane production. Instead, EtOH-fermentation improved the methane yield, as methane production of the organic matter after fermentation was higher than that of the feed for EtOH production. The highest total energy yield in the combined bioethanol and biogas production was achieved with the corn preserved with formic acid.

Keywords Biogas, Methane, Ethanol, Corn, Silage

Pages 38 p + appendices 3 p.



SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	MAISSI.....	2
2.1	Viljelymäärät maailmalla	2
2.2	Viljely Suomessa.....	2
2.3	Maissin koostumus.....	3
2.4	Maissin korjuujäännös ja sen hyödyntäminen	3
3	SÄILÖNTÄ	5
3.1	Luonnollisesti tuotettu säilörehu	5
3.1.1	Säilönnän vaiheet.....	5
3.1.2	Säilörehuun muodostuneet hapot	6
3.2	Muurahaishapolla säilöminen	7
4	LIGNOSELLULOOSAPITOISEN MATERIAALIN HYDROLYYSI	8
4.1	Lignoselluloosapitoinen materiaali	8
4.1.1	Selluloosa	8
4.1.2	Hemiselluloosa	9
4.1.3	Ligniini	9
4.2	Entsymaattinen hydrolyysi.....	9
4.2.1	Entsyymit.....	10
4.3	Happohydrolyysi	11
5	BIOETANOLI JA BIOKAASU	12
5.1	Bioetanolin tuotanto	12
5.1.1	Bioetanolin tuotanto	12
5.1.2	Fermentointiprosessi.....	14
5.1.3	Bioetanolin energiasisältö	15
5.1.4	Bioetanolin Suomessa	15
5.2	Biokaasu	15
5.2.1	Biokaasun tuotanto	15
5.2.2	Biokaasun energiasisältö	16
6	ETANOLIFERMENTOINTIKOE	17
6.1	Materiaalit ja menetelmät.....	17
6.1.1	Maissi	18
6.1.2	Entsyymit ja hiiva.....	18
6.1.3	Esikäsittelyt	18
6.2	Analyysit	18
6.2.1	TS/VS määrittely	18
6.3	Toteutus.....	19

7	METAANINTUOTTOKOE.....	20
7.1	Materiaalit ja menetelmät.....	20
7.1.1	Raaka-aineet	20
7.1.2	Esikäsittelyt	21
7.1.3	Analyysit.....	21
7.2	Toteutus.....	22
8	KOETULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	23
8.1	Fermentointi	23
8.1.1	Näytteiden koostumus ennen fermentointia	23
8.1.2	Maissi tuore	24
8.1.3	Maissi säilötty.....	25
8.1.4	Muurahaishapolla säilötty maissi	26
8.1.5	Näytteiden koostumus fermentoinnin jälkeen	28
8.1.6	Tulokset fermentoinnista	28
8.2	Metaani.....	29
8.2.1	Maissi tuore	29
8.2.2	Maissi säilötty.....	30
8.2.3	Muurahaishapolla säilötty maissi	31
8.2.4	Näytteiden koostumus metaanintuoton jälkeen.....	32
8.3	Tuottovertailu	33
8.4	Energia-arvot.....	34
9	JOHTOPÄÄTÖKSET	35
	LÄHTEET	36

Liite 1	Fermentoinnin toteutus
Liite 2	Metaanintuottotestin toteutus
Liite 3	Metaanintuottotulokset

1 JOHDANTO

EU:n ilmasto- ja energiapolitiikka sekä tarve vähentää hiilidioksidipäästöjä on lisännyt kiinnostusta korvata fossiilisia polttoaineita uusiutuvilla energialähteillä. Yhtenä keskeisenä ohjauskeinona tähän on EU:n RES-direktiivi 2009/28/EY, jossa liikennepolttoaineiden uusiutuviin energialähteisiin perustuvan polttoaineen velvoiteosuudeksi on asetettu EU:n jäsenmaissa 10 % vuoteen 2020 mennessä. Tähän pyritään mm. jätteistä ja lignoselluloosasta tai selluloosasta valmistettujen biopolttoaineiden avulla, sillä niiden energiasisältö voidaan laskennallisesti tuplata kun tavoitellaan 20 %:n bio-osuutta. (VTT 2011.) Vaihtoehtoisia liikenteen biopolttoaineita ovat pääasiassa biodiesel, bioetanoli ja biometaani, joista kahteen jälkimmäiseen keskitytään tässä opinnäytetyössä.

Bioetanolia käytetään Suomessa tällä hetkellä liikenteen polttoaineissa 95 E10:ssä enintään 10 %, 98 E5:ssä enintään 5 % ja RE85:ssä 80-85 % bensiinin seassa. Liikenne bioetanolia tuotettiin Suomessa vuonna 2010 alle 10 miljoonaa litraa, joka oli jäteperäistä etanolia. Biokaasua puolestaan käytetään Suomessa lähinnä lämmön- ja sähkön tuotantoon, mutta myös jossain määrin liikenteen polttoaineena.

Aiheen tekee ajankohtaiseksi myös uusi syöttötariffi biokaasulle, joka lisää biokaasuntuotannon kannattavuutta Suomessa. Myös bioetanolin ekotehokkuuden lisääminen on ajankohtaista, koska tämänhetkiseen bioetanolin valmistamiseen kuluu huomattavasti fossiilisia polttoaineita.

Tämän työn keskeisinä tavoitteina oli selvittää rehuman maissin, sisältäen maissin kasvibiomassan lukuun ottamatta juuria, soveltuvuutta yhdistettyyn bioetanoli- ja biokaasutus-käsittelyyn sekä verrata säilömismenetelmien vaikutusta raaka-aineeseen ja tuottoihin. Lisäksi tarkasteltiin bioetanolintuottovaiheen vaikutusta sen jälkeisen biokaasutuksen metaanintuottoihin.

Työ liittyi Helsingin yliopistossa samanaikaisesti käynnissä olevaan Annukka Pakarisen väitöskirjatutkimukseen ”Evaluation of fresh and preserved annual bioenergy crops in boreal zone for biogas and ethanol production”.

2 MAISSI

Maissi kuuluu heinäkasvien heimoon ja se on lähtöisin Keski-Amerikasta. Sen ensimmäisiä viljelijöitä olivat amerikkalaiset intiaanit, jotka viljelivät maissia vuorten rinteillä. Nykyään viljely tapahtuu suurimmaksi osaksi pelloilla. (Cheng 2010, 45.) Maissin viljelyssä tulee ottaa huomioon sen tarvitsemat lämpöiset, multavat sekä hallalta suojaisat kasvupaikat. Myös avoimuus kasvupaikalla on tärkeä, jotta maissi pystyy tuulessa pölyttymään. Maissi kasvattaa 1-3 tähkää sekä suuren korren. (Maissi- taimikasvatus ja hoito 2009.) Tähkässä kasvavat jyvät ovat ihmiselle ravinnoksi kelpaavia ja korresta pystyy tekemään esimerkiksi rehua. Nykyisin kasvatettavat lajit eivät pärjäisi enää luonnossa (Acquaah 2005, 585).

2.1 Viljelymäärät maailmalla

Maissia kasvatetaan maailmanlaajuisesti neljänneksi eniten kaikista viljelykasveista edellään vain vehnä, riisi ja peruna. Sitä viljellään 133 miljoonalla peltotehtaalla vuosittain. Näistä noin 3,5 miljoonaa hehtaaria tuotetaan ainoastaan säilörehua. Suurimpia maissin tuottajia ovat Yhdysvallat, Kiina, Brasilia, Meksiko, Ranska ja Argentiina. Niiden osuus koko maailman tuotannosta on noin 75 %. (Acquaah 2005, 585-586.) Maissia tuotetaan arviolta noin 410 miljoonaa tonnia vuosittain (Walker 2010, 36).

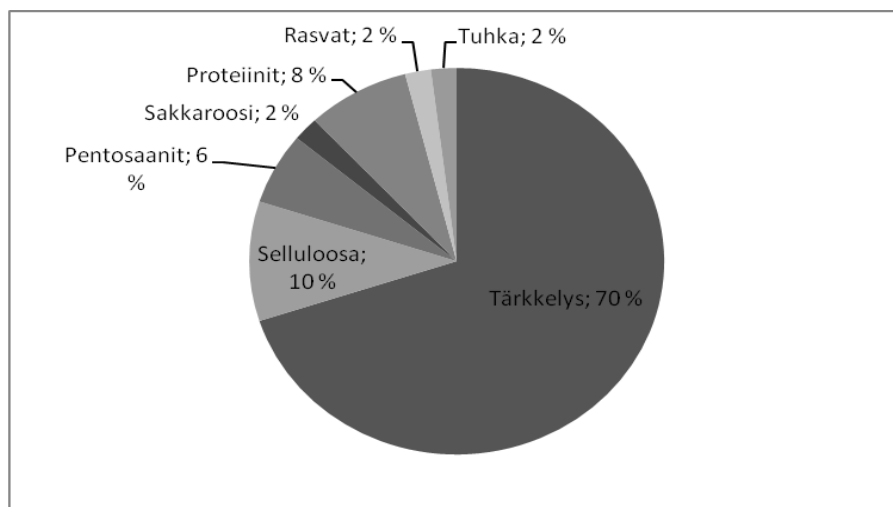
2.2 Viljely Suomessa

Maissilla on suuri geologinen sopeutumiskyky. Se pystyy kasvamaan eri korkeuksilla esimerkiksi vuoristossa sekä täysin eri leveyspiireillä pohjoisesta etelään. Maissi kasvaa myös Suomessa, mutta ei ilman ongelmia. Ongelmana on kasvukauden lyhyys, koska maissi tarvitsee vähintään 140 päivää ilman pakkasia ja vaatii maan lämmöksi yli 12 °C. Optimaalinen maissin pH viljelymaalle on 6-7 välillä ja sen ollessa alle 5,5 alkavat ravinteet olla hyödyntämättömässä muodossa. (Laine 2009, 7; Acquaah 2005, 587.)

Kalenterivuorokausia paremmin eri kasvien ja lajikkeiden vaatimien kasvukausien pituutta pystytään kuvaamaan tehokkaalla lämpösummalla. Se saadaan maissille laskemalla yhteen kasvukauden aikana kaikkien vuorokausien keskilämpötilan +10 °C ylittävä osa ja sen yksikkö on astepäivä °Cvrk. (Kangas ym. 2010, 10-12; Hakala ym. 2011, 6.) Rehumaissin tarvitsema lämpösumma on 700-850 °Cvrk. Suomessa maissin kasvatukselle riittäviä tehoisia lämpösummia kertyi esimerkiksi vuonna 1985 riittämätön määrä, mutta tulevaisuudessa, jo vuonna 2025 lämpösumman on oletettu riittävän lähes Keski-Suomessa asti. Ilmaston lämmetessä raja siirtynee vieläkin pohjoisemmaksi. (Hakala ym. 2011, 6.)

2.3 Maissin koostumus

Maissin jyvät koostuvat suurimmaksi osaksi tärkkelyksestä. Tärkkelystä niissä on Watsonin (1982) ja Allenin (1979) mukaan 64-78 % kuiva-aineesta. Muita hiilihydraatteja maisseissa ovat selluloosa 8,3-11,9 %, pentosaanit 5,9-6,6 %, sakkaroosi 0,5-3,3 % ja muut sokerit (monomeerisia) kuten glukoosi, fruktoosi ja raffinoosi pienemmissä määrin. Proteiinia maississa on Bressanin ja Mertzin (1958) mukaan 8-18 % kuiva-aineesta ja sen pääasialliset aminohapot ovat prolamiini, gluteliini, globuliini ja albumiini. Rasvan määrä maississa vaihtelee 1-6 % ja se vaikuttaa myös muihin aineisiin (Queckenbushin 1962). Vähentynyt tärkkelyksen määrä ja parantunut proteiinien laatu kertovat korkeasta rasvapitoisuudesta. Tuhkaa jyvissä on Watsonin (1982) mukaan 1-4 %. (Cheng 2010, 45-47.) Kuviossa 1. on esitettyä maissin koostumus laskettuna keskiarvoina edellä mainituista lähteistä.



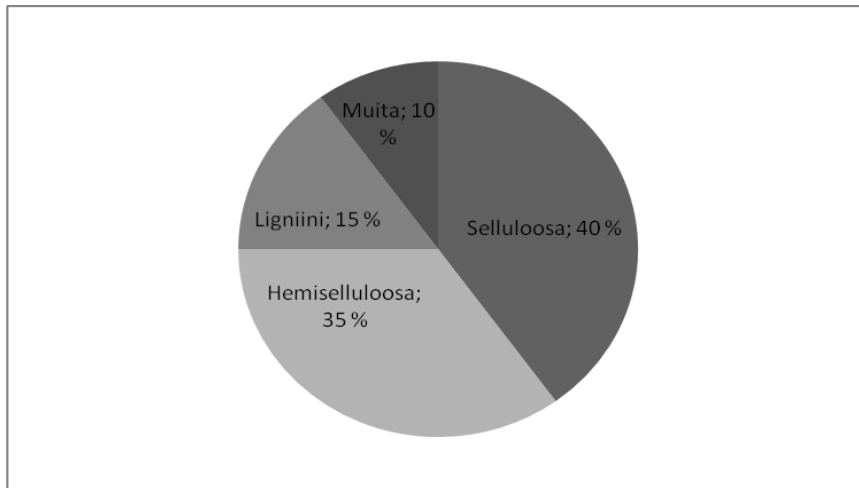
Kuvio 1 Maissin keskimääräinen koostumus (Cheng 2010, 45-47)

2.4 Maissin korjuujäännös ja sen hyödyntäminen

Maissin jätettä muodostuu noin 1 kg jokaista kiloa jyvän kuivapaino kiloa kohti. Jäte voidaan jättää pellolle ehkäisemään eroosiota ja säilyttämään ravinteita tai vaihtoehtoisesti se voidaan hyötykäyttää esimerkiksi bioetanolina. Maailman maissin tuotantomäärät vastaavat hyvin lähelle samaa määrää jätteen saatavuudessa. Mahdollisuutena siis on tuottaa 410 miljoonasta tonnista lignoselluloosapitoista maissijätettä noin 275 litraa bioetanolia / tonni jätettä, eli yhteensä noin 1500 miljoonaa litraa. (Walker 2010, 36.)

Maissin jätteen eli kaiken mikä jää pellolle sadon korjuun jälkeen, koostumuksessa on Kadamın ja McMillanin (2003) mukaan selluloosaa 35-40 %, hemiselluloosaa 17-35 % ja ligniiniä 7-18 %. Jätteessä on mukana ruoko, lehdet, kuori ja tähkä. (Cheng 2010, 49-50.) Kuviossa 2 on esitettyä maissin korjuujäännöksen koostumus pääkomponenttien osilta.

Maissin yhdistetty bioetanoli- ja biokaasutuotanto



Kuvio 2 Maissin korjuujäännöksen koostumus pääkomponenttien osuudet (Cheng 2010, 49-50)

3 SÄILÖNTÄ

Säilönnässä pyritään mahdollisimman pieniin laadun tai määrän heikkenemisiin pitkälläkin aikavälillä. Laatu- ja määrähäviöitä voivat aiheuttaa fyysinen-, kemiallinen-, fotokemiallinen- sekä biologinen pilaantuminen. Säilömismenetelmiä on useita. Suurin osa niistä perustuu happi määrän, pH:n, lämpötilan tai kosteuden säätämiseen säilöttävässä aineessa. Monessa menetelmässä käytetään hyödyksi myös näiden yhdistelmiä. Säilönnän avulla mahdollistuu rehun sekä ruoan ympärivuotinen hyötykäyttö, vaikka kasvukausi rajoittuukin kesään. (Acquaah 2005, 502-505.)

Käytännössä biokaasulaitosten syötteenä käytettävää maissia varastoidaan samalla tavalla, kuin säilörehua yleensä. Aluksi poistetaan mahdollisimman paljon ilmaa kasaamalla ja puristamalla rehua. Seuraavaksi rehukasa peitetään muovilla ja varmistetaan ilman pääsemättömyys rehun sekaan laittamalla painoja muovin päälle. Jos ilmaa pääsee rehun sekaan, se aiheuttaa rehun laadun heikkenemistä. (UK Agriculture 2011.)

Seuraavassa käsitellään vähän tarkemmin nykyisiä säilöntämenetelmiä: luonnollisesti säilöttyä säilörehua ja säilöntää muurahaishapolla.

3.1 Luonnollisesti tuotettu säilörehu

Säilörehun tuotannon periaatteena on fermentointiprosessi, joka toteutuu anaerobisissa olosuhteissa. Onnistuneessa säilönnässä ravintoaineiden hävikki on hyvin pieni. Säilörehun tuottamisessa hyötyinä ovat sadon korjuu kosteana (pellolla kuivaaminen ei välttämätöntä), ravintoaineiden hävikin pienuus ja säilyvyys talven aikaiseen käyttöön. (Acquaah 2005, 513-514.)

Suurimpina ongelmina säilömisessä ovat aerobiset olosuhteet, materiaalin huono laatu sekä väärä kosteuspitoisuus. Huonolaatuiseen aerobisissa oloissa valmistettuun säilörehuun kertyy paljon ammoniakkia, vetysulfidia ja voi happoa (eli butyyrihappo), kun taas normaalisti anaerobisesti muodostuisi voi happoa ja maitohappoa. Tavoite kosteuspitoisuus on välillä 60-70 %. Liian suuressa kosteuspitoisuudessa saattaa muodostua ei-haluttuja orgaanisia happoja ja pH ei laske riittävän alas. Liian matala kosteusprosentti taas vaikeuttaa anaerobisen tilan saavuttamista ja mm. homeet pääsevät kasvamaan. (Acquaah 2005, 514-517.)

3.1.1 Säilönnän vaiheet

Säilöminen tapahtuu viidessä eri vaiheessa ja se ei ole samanlaista kaikille kasvilajeille, mutta periaate on täysin sama (Acquaah 2005, 516). Säilöntätulokseen vaikuttavat rehun ominaisuudet, kuten sen sisältämät liukoiset hiilihydraatit, rehun puskurikapasiteetti ja kasvin mikrobit (Sipilä ym. 2006, 2). Fermentointi on siinä tärkein biokemiallinen prosessi. Prosessin aikana tapahtuvat muutokset ovat kosteuspitoisuuden-, lämmön-, happamuuden ja hapen muutoksia. (Acquaah 2005, 516.) Maitohappo on tehokain happamuuden lisääjä ja sen energia- ja kuiva-ainetappiot ovat huo-

mattavasti pienemmät, kuin jos tuloksena on etikka- tai erityisesti voihap-
poa (Sipilä ym. 2006, 1).

- Ensimmäisessä vaiheessa rehu pilkotaan ja suljetaan siiloon tai kääritään muoviin. Tässä vaiheessa kannatta välttää liiallisen hapen pääsyä prosessiin, koska tarkoituksena on saada prosessista anaerobinen. Aerobinen prosessi kuluttaa hiilihydraatteja, ja johtaa hiilidioksidin muodostumiseen sekä lämmön nousuun. Liian korkealle noussut lämpö voi johtaa rakenteen heikkenemiseen ja lopulta huonolaatuiseen säilörehuun.
- Ensimmäisen vaiheen hapellisissa olosuhteissa toimivat mikrobit ovat kuluttaneet kaiken hapen ja tästä seuraa anaerobinen vaihe. Fermentoituvat hiilihydraatit ovat ravintona anaerobisille mikrobeille, jotka muodostavat niistä orgaanisia happoja lähinnä etikkahappoa. Tästä seuraa pH:n lasku 6,0:sta 4,2:een.
- Seuraavassa, kolmannessa vaiheessa etikkahapon tuotto pysähtyy ja alkaa maitohapon muodostuminen. Tämä johtuu maitohappobakteereille suotuisien olosuhteiden muodostumisesta ja ne lisääntyvät tässä vaiheessa nopeasti.
- Neljännessä vaiheessa bakteerien toiminta estyy pH:n laskun takia (pH 3,8) ja hiilihydraattien hajoaminen loppuu. pH:n lasku johtuu muodostuneiden orgaanisten happojen, lähinnä maitohapon vaikutuksesta.
- Viimeisessä vaiheessa pH pysyy tasaisena ja hapot estävät hiilihydraattien hajoamisen ja käytön. Alhainen pH estää myös homeiden ja bakteerien toiminnan. (Acquaah 2005, 516.)

3.1.2 Säilörehuun muodostuneet hapot

Voihappo muodostuu säilörehuun butaanihappobakteerien toiminnan tuloksena. Voihapolle ominaista on hyvä liukeneminen veteen, etanoliin ja eetteriin. Se on puhtaana väritöntä ja öljymäistä nestettä ja sillä on vahva härski haju. Voihapon kiehumispiste on 163,5 °C ja sen kaava on $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$. (Alèn 2009, 361.)

Maitohappo muodostuu hiilihydraattipitoisten raaka-aineiden käymisessä. Sen muodostaa *Lactobacillus* -suvun bakteerit normaalissa metaboliasaan. Käymisteitse muodostunut maitohappo on D-(-)-maitohappo ja se on puhtaana lähes väritön, hygroskooppinen ja kiteinen massa tai siirappimainen neste. Maitohappo liukenee hyvin veteen ja etanoliin, mutta niukasti eetteriin. Sen normaali kiehumispiste on 110 °C ja sitä kuumennettaessa muodostuu erilaisia kondensoitumistuotteita kuten dimaitohappoa. Kiehumispisteeseen vaikuttaa paine alentavasti eli kun painetta on 2 mmHg, on kiehumispiste 103 °C. (Alèn 2009, 454.)

Etikkahappo eli etaanihappo on puhtaana kirkasta ja väritöntä nestettä ja sillä on pistävä haju. Se liukenee kaikissa suhteissa veteen, etanoliin, eetteriin, asetoniin ja bentseeniin. Etikkahapon kiehumispiste on 117,9 °C (1 atm) tai 17 °C paineessa 10 mmHg. Etikkahapon kaava on $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$. (Alèn 2009, 336.)

3.2 Muurahaishapolla säilöminen

Muurahaishappoa eli metaanihappoa valmistetaan sivutuotteena hiilivetyjen nestefaasihapetuksessa valmistettaessa etaanihappoa. Muurahaishappo on vesikirkasta ja pistävänhajuista nestettä ja se liukenee helposti veteen, etanoliin ja eetteriin. Veden kanssa se muodostaa seoksen, joka sisältää 77,5 % happoa ja se kiehuu 107,3 °C:ssa. Puhtaan muurahaishapon kiehumispiste on 100,7 °C tai 50 °C paineessa 120 mmHg. Se reagoi sekä hapon, että aldehydin tavoin ja sen kaava on HCO_2H . (Alèn 2009, 329.)

Muurahaishapolla säilömisessä pyritään laskemaan pH:ta nopeasti. Tällöin muurahaishapon lisääminen vähentää maitohapon, etikkahapon, voihamon sekä ammoniumtypen pitoisuutta. pH:n laskeminen estää hiilihydraattien hajoamisen ja käytön, joten muurahaishapolla säilötyssä rehussa on enemmän hiilihydraatteja kuin luonnollisesti tuotetussa säilörehussa eli painorehussa. Myös etanolia sekä proteiineja säilyy enemmän muurahaishapolla säilötyssä rehussa kuin painorehussa. Nopea pH:n alentaminen estää happamuudelle herkkien bakteerien toiminnan, jolloin maitohappobakteerit pääsevät lisääntymään hyvin nopeasti. Toinen mahdollisuus on, että muiden happojen muodostuminen estyy täysin, eli pH laskee hyvinkin paljon. Muurahaishappo alentaa pH:ta riippuen sen annostuksesta, säilöttävän aineen vesipitoisuudesta sekä puskurointikapasiteetista. Muurahaishappo myös vapauttaa solunestettä kasvin soluista ja soluneste on erinomainen substraatti mikrobeille. (Blomqvist 2010, 6-8.)

4 LIGNOSELLULOOSAPITOISEN MATERIAALIN HYDROLYYSI

Hydrolyysiä käytetään esikäsittelynä etanolin valmistuksessa, jotta prosessissa saataisiin selluloosan ja hemiselluloosan polymeereistä sokerit hiivan käytettäväksi, helpommin fermentoituvaan muotoon. Hemiselluloosa depolymerisoituu 5- ja 6- arvoisiksi sokereiksi (pentoosit ja heksoosit). Selluloosa pilkkoutuu glukoosiksi. (Fulekar 2010, 65.) Esimerkkeinä heksooseja ovat glukoosi, fruktoosi sekä galaktoosi ja pentooseista esimerkkeinä ovat ksyloosi ja arabinoosi.

4.1 Lignoselluloosapitoinen materiaali

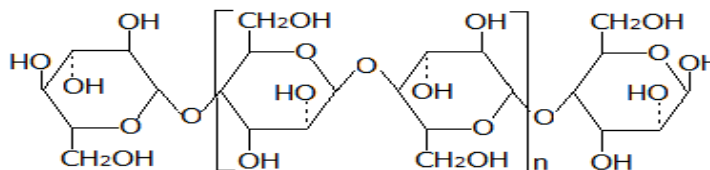
Orgaaninen hiili on sitoutunut luonnossa suurimmaksi osaksi kasvien soluseinässä sijaitseviin polymeereihin kuten selluloosaan, hemiselluloosaan ja ligniiniin. Nämä muodostavat lignoselluloosapitoisen materiaalin, kuten maissin korjuujäte. (Maier ym. 2000, 323.) Selluloosa ja hemiselluloosa ovat hyvin kestävässä muodossa, jossa ne ovat linkittyneet yhteen ligniinillä. Ligniini suojaa selluloosaa ja hemiselluloosaa kasvien soluseinämässä. Lignoselluloosapitoisen materiaalin rakenne on esitetty kuvassa 1. (Mosier ym. 2005, 674.)



Kuva 1 Lignoselluloosapitoinen materiaali Hsun mukaan (1980) (Mosier ym. 2005, 674)

4.1.1 Selluloosa

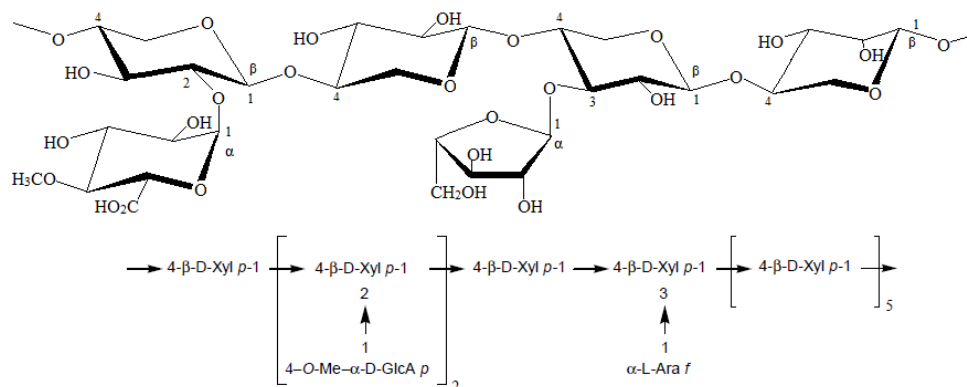
Selluloosa on yleisin kasvipolymeeri maapallolla. Se koostuu β -1,4 linkittyneistä glukoosin yksiköistä ja se on lineaarinen ketju. Jokaisessa molekyylissä on 1000:sta 10000:een yksikköä. Selluloosa on myös liukenematon veteen. (Maier ym. 2000, 323.) Kuvassa 2 on esitetty selluloosan perusrakenne, jossa on useita glukoosiyksiköitä.



Kuva 2 Selluloosan perusrakenne (Cheng 2010, 222.)

4.1.2 Hemiselluloosa

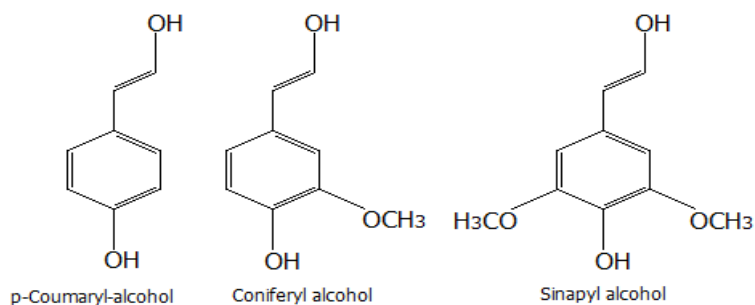
Hemiselluloosat muistuttavat rakenteeltaan selluloosaa, mutta poiketen selluloosasta, ne ovat heterogeenisiä, useita eri monosakkarideja sisältäviä polysakkarideja. Hemiselluloosat ovat myös haaroittuneita tai ne sisältävät pienimolekyylisiä sivuryhmiä. Hemiselluloosissa on esimerkiksi heksooseja ja pentooseja. Lisäksi se sisältää jossain määrin hajoavia, mutta esimerkiksi metanolyysikäsitelystä helposti esille tulevia uronihappoja. (Maier ym. 2000, 325.) Kuvassa 3 on esitettyä ksylaanin rakenne esimerkkinä hemiselluloosan rakenteesta.



Kuva 3 Ksylaanin rakenne (Laine, C 2005, 16.)

4.1.3 Ligniini

Ligniini määritellään vahvasti ristiin linkittyneeksi aromaattiseksi fenyylipropaaniyksiköiden polymeeriksi. Siihen on liittynyt yli 10000 yksikköä. Ligniinin muodostuminen tapahtuu aromaattisista aminohapoista monolignoleiksi ja edelleen nämä monolignolit muodostavat ligniinin polymerisoidumalla sattumanvaraisesti toisiinsa (kuva 4). Ligniinin tehtävänä on suojata kasvia patogeeneiltä, vahvistaa solujen seinämiä ja tukea sitä. (Maier ym. 2000, 325.)



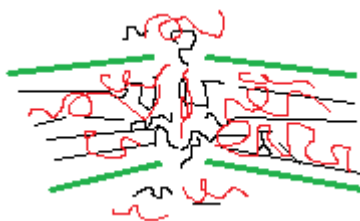
Kuva 4 Ligniinin perusrakennusaineet, monolignolit (Davin, B. 2005, 408.)

4.2 Entsymaattinen hydrolyysi

Lignoselluloosapitoisen materiaalin entsyymaattisella hydrolyysillä tarkoitetaan biokemiallista selluloosan ja hemiselluloosan depolymerisointia. Siinä selluloosa pilkkoutuu glukoosiksi ja hemiselluloosa pentooseiksi ja heksooseiksi. Käytettävät entsyymit ovat sellulaasi- ja hemisellulaasient-

syymeitä, jotka ovat Béguinin ja Aubertin (1994) mukaan hyvin spesifisiä. Yleensä entsyymaattinen hydrolyysi suoritetaan 45-70 °C:ssa riippuen entsyymien optimilämpötilasta. Prosessissa pH on yleensä lähellä viittä, joten korrodoivat vaikutukset ovat vähäisiä. (Cheng 2010, 229-230.)

Esikäsittelynä entsyymaattiselle hydrolyysille voidaan käyttää esimerkiksi biologista, kemiallista tai fysikaalista käsittelyä (Cheng 2010, 223-228). Säilöntää, jossa muodostuneet tai lisätyt hapot mahdollisesti avaavat joitakin sidoksia ja vapauttavat selluloosaa ja hemiselluloosaa entsyymien käyttöön, voidaan mahdollisesti pitää eräänlaisena esikäsittelynä. Kuvassa 5 on esitetty esikäsittelyn toivottu vaikutus materiaalin hajoamiseksi (Mosier ym. 2005, 674; Pakarinen ym., 2011, 1-13).



Kuva 5 Toivottu vaikutus lignoselluloosapitoisen materiaalin esikäsittelylle Hsun mukaan (1980) (Mosier ym. 2005, 674)

Höyryräjäytys on yleisin esikäsittelymenetelmä ennen entsyymaattista hydrolyysiä. Siinä materiaalia kuumennetaan paineistetulla höyryllä usean minuutin ajan. Tämän jälkeen paine lasketaan nopeasti. (Rättö, Vikman & Siika-aho 2009, 29.) Paineenalennus johtaa lignoselluloosan rakenteen rikkoutumiseen (Niskanen, P. 16.)

4.2.1 Entsyymit

Entsyymit ovat hyvin spesifisiä proteiineja, jotka pilkkovat tiettyjä substraatteja mikro-organismien, kuten bakteerien ja sienien käyttöön metaboliassa. Entsyymejä muodostuu mikro-organismien soluissa ja mikrobit voivat myös vapauttaa entsyymejä solun ulkopuolelle. Solun ulkoisia entsyymejä mikro-organismit käyttävät suurien polymeerien, kuten selluloosan ja hemiselluloosan depolymerisointiin, helpottaakseen yhdisteiden pääsyä solun sisälle substraatiksi. (Maier ym. 2000, 259-260; Cheng 2010, 229-230.) Taulukkoon 1 on kerättyä tietoa lignoselluloosapitoisen materiaalin hydrolyysissä käytetyistä entsyymeistä.

Taulukko 1 Entsyymit lignoselluloosapitoisen materiaalin depolymerisointiin (Cheng 2010, 230-233.)

Entsyymi	Lähteenä		Optimi pH	Optimi T	Kuvaus	Erityistä	Esimerkkejä entsyymiä tuottavasta lajista
	Bakteerit	Sienet					
Endoglukanaasi	x	x	4-8 riippuen entsyymin lähteestä	45-70 °C riippuen entsyymin lähteestä	Pilkkoo selluloosan sisäisiä sidoksia, suosien amorfiseta osaa		<i>Aspergillus</i> , <i>Phanerochete chrysosporium</i> , <i>Trichoderma</i> ja <i>Humicola</i> sienet & <i>Clostridium</i> , <i>Thermomonospora</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> ja <i>Bacillus</i> bakteerit
Eksoglukanaasi, eli cellobiohydraasi		x	4,5-5	50 °C	Ainoa tehokkaasti kiteistä selluloosaa pilkkova		<i>Coniophora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Humicola</i> , <i>Penicillium</i> & <i>Trichoderma</i>
β -glukosidaasi	x	x	4,5-6,8 riippuen entsyymin lähteestä	30-65 °C riippuen entsyymin lähteestä	Pilkkoo sellobioosia glukosiksi	Voi parantaa selluloosan hydrolyysyä vähentämällä cellobioosin* määrää	<i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Humicola</i> , ja <i>Saccharomyces</i> sienet & <i>Clostridium</i> , <i>Ruminococcus</i> ja <i>Streptomyces</i> bakteerit
Muut entsyymit	x	x			Lukuisia entsyymejä, jotka pilkkovat hemiselluloosaa		ksylanaasi, β -ksylosidaasi, glukuronidaasi, asetylesteraasi, galactomannaasi ja glukomannaasi

* Cellobioosi on endoglukanaasille sekä eksoglukanaasille kilpaileva ja inhiboiva lopputuote

4.3 Happohydrolyysi

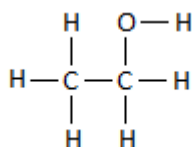
Happohydrolyysi voidaan käyttää entsymaattisen hydrolyysin tapaan lignoselluloosapitoisen materiaalin depolymerisoinnissa. Tällöin materiaali pilkotaan väkevillä hapoilla, kuten rikkihapolla tai suolahapolla. Menetelmä on hyvin tehokas, mutta hapot aiheuttavat korroosiota, sekä ne ovat vaarallisia ja myrkyllisiä. Näistä johtuen happohydrolyysi on huomattavan kallis menetelmä selluloosien hydrolysointiin. (Cheng 2010, 226.)

5 BIOETANOLI JA BIOKAASU

Bioetanolia ja biokaasua tuotetaan bioteknisesti prosessoimalla. Bioetanolia fermentoidaan yksinkertaisista sokereista, joten raaka-aineeksi sopivat näitä sokereita sisältävät polymeerit. Sen sijaan biokaasua voidaan tuottaa monipuolisemmasta raaka-ainepohjasta.

5.1 Bioetanoli

Etanoli eli etyylialkoholi on väritöntä, polttavanmakuista ja helposti haihtuvaa. Se myös syttyy helposti ja palaa sinisellä liekillä. Etanoli sitoo vettä ilmasta eli on hygroskooppinen aine. Se liukenee kaikissa suhteissa veteen, eetteriin sekä asetoniin. Etanolin kiehumispiste on 78,3 °C tai 4 °C paineessa 16 mmHg. Etanolin kaava on CH₃CH₂OH (kuva 6). (Alèn 2009, 130.) Etanoli usein lyhennetään muotoon EtOH, jossa Et tarkoittaa C₂H₅-. Bioetanoli on käsite, joka kuvaa etanolin käyttöä uusiutuvana polttoaineena. Bioetanolia voidaan käyttää joko biopolttoaineena sellaisenaan tai oktaaniarvoa nostavana, fossiilisia päästöjä vähentävänä lisäaineena bensinissä. (Fulekar 2010, 63.)



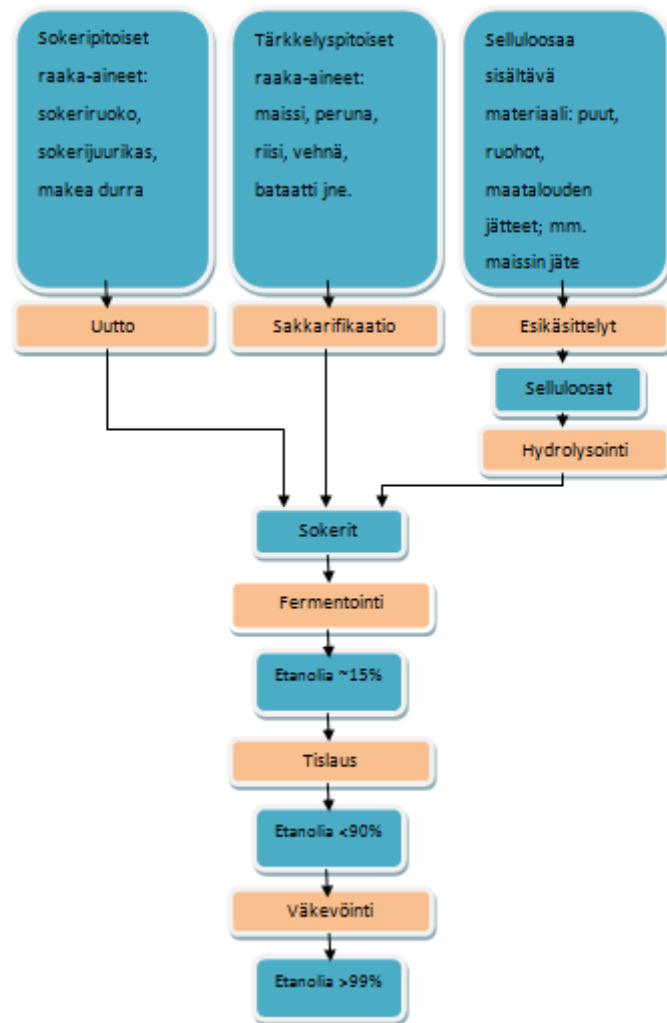
Kuva 6 Etanolin kemiallinen kaava

Bioetanolin poltto ja valmistus vapauttavat hiilidioksidia ilmakehään. Poltossa vapautuva CO₂ on kuitenkin ns. hiilineutraalia CO₂:a, sillä kasvit sitovat fotosynteesissä hiilidioksidia takaisin C-kiertoon. (Fulekar 2010, 66.)

5.1.1 Bioetanolin tuotanto

Etanolia tuotetaan anaerobisella käymisellä. Sen lähtöaineena ovat erilaiset yksinkertaisia sokereita tai tärkkelystä sisältävät raaka-aineet. Jos etanolia tuotetaan suurimolekyyllisiä hiilihydraatteja sisältävästä raaka-aineesta, täytyy raaka-aine aluksi hydrolysoida. Hydrolyysillä pitkäketjuiset hiilihydraatit depolymerisoidaan fermentoitavaan muotoon. Etanoli-fermentoinnissa glukoosi muuntuu etanoliksi ja hiilidioksidiksi seuraavan kaavan mukaan:

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{ADP} \rightarrow 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{ATP} + 10,6 \text{ kJ.}$$
 Käymisessä käytetään hyödyksi erilaisia bakteereja tai hiivasieniä joista eniten käytetty on hiiva *Saccharomyces cerevisiae*. (Fulekar 2010, 63-66.) Kuviossa 3 on esitettyä etanolituotannon reitit.

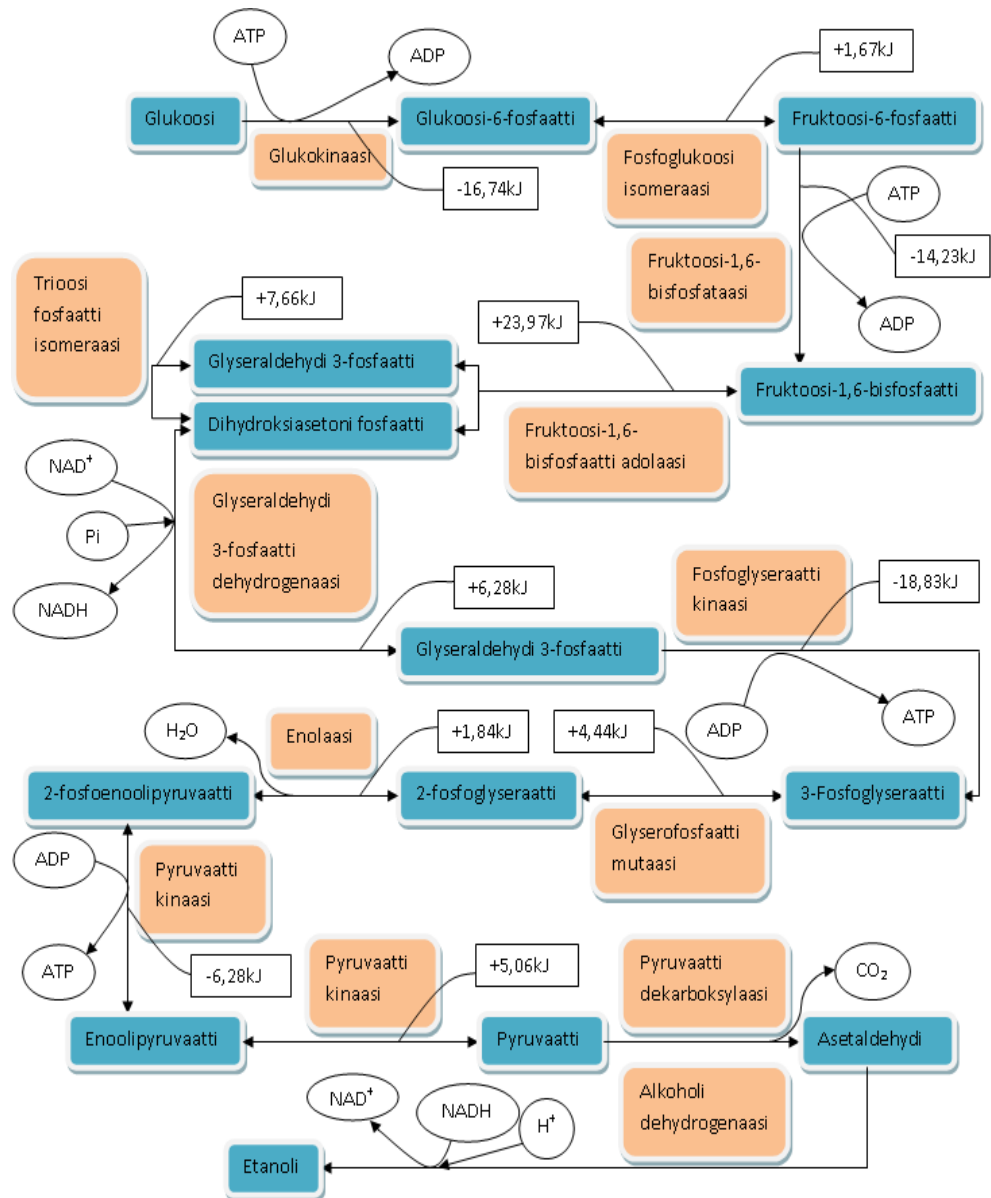


Kuvio 3 Etanolintuotanto erilaisista uusiutuvista materiaaleista (Cheng 2010, 212.)

Edistyneempi bioetanolintuotanto, josta käytetään myös nimitystä 2. sukupolven bioetanoliprosessointi, keskittyy selluloosapitoisten raaka-aineiden käyttämiseen bioetanolin valmistuksessa. Näitä raaka-aineita ovat esimerkiksi metsätalouden ylijäämät, puut, ruohot ja maataloudesta syntyvä jäte. Selluloosapitoisen materiaalin käyttö raaka-aineena on huomattavasti perinteisiä raaka-aineita, kuten maissin jyvää kalliimpaa ja vähempi tuottoista. Vaikka itse materiaali on halvempaa, niin kustannuksia tulee esimerkiksi vielä kalliista entsyymeistä, suuremmasta esikäsittelytarpeesta ja pidemmistä prosessointiajoista. (Fulekar 2010, 65-66.)

5.1.2 Fermentointiprosessi

Fermentointiprosessi perustuu bakteerien tai hiivan entsyymien toimintaan. Aluksi glukoosi kulkeutuu solun sisälle, jossa sarja entsyymien reaktioita muodostaa siitä etanolia, hiilidioksidia ja energiaa. Energiaa kuluu solun toimintaan, kasvamiseen ja lämpöön. Etanoli ja hiilidioksidi kulkeutuvat solun ulkopuolelle, jossa etanoli liukenee nesteeseen ja hiilidioksidi kulkeutuu kuplina pois nesteestä. Normaalissa tilanteessa fermentointi on valmis noin 12 tunnin kuluttua, mutta pitkäkestoisessa fermentoinnissa se voi kestää 40-48 tuntia. (Cheng 2010, 234-235.) Kuviossa 4 on esitetty entsyymien toiminta glukoosin fermentoinnissa.



Kuvio 4 Glukoosin fermentointi etanoliksi (Cheng 2010, 236-239)

5.1.3 Bioetanolin energiasisältö

Bioetanolin energiasisältö on 5,9 kWh/l, kun se bensiinillä on noin 9 kWh/l. Tästä johtuen auton polttoainekulutus nousee, mitä enemmän etanolia on bensiiniin sekoitettuna. Jos etanolin osuus on 10 % (E10 -laatu), niin sen polttoaineen kulutus on noin 3,5 % suurempi pelkkään bensiiniin verrattuna ja 98E:llä ero on noin 1,75 %. (Kallberg 2011.) VTT on kuitenkin vielä julkaisemattomissa tutkimuksissaan osoittanut kulutuksen olevan suunnilleen sama 98E ja E10:llä eli eroa on vain noin 0,8 prosenttia johtuen 98E:hen lisättävistä aineista. Nämä aineet vähentävät 98E:n oktaanilukua. (Arola 2011, Helsingin Sanomat 11.5.2011, B4.)

5.1.4 Bioetanoli Suomessa

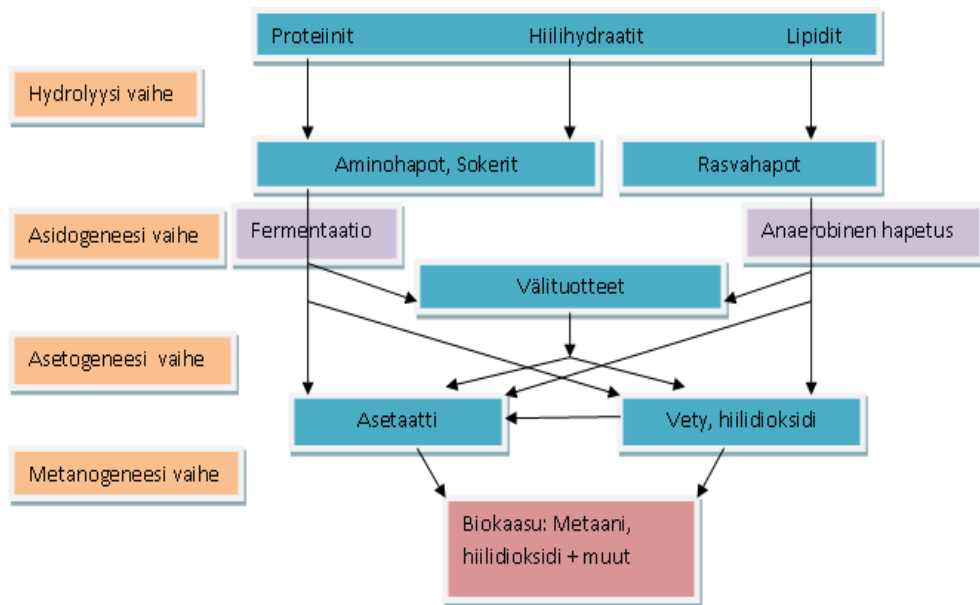
Bioetanolia valmistettiin Suomessa vuonna 2010 alle 10 miljoonaa litraa liikennekäyttöön (Laine 2011). Toistaiseksi Suomessa St1:n Etanolix -laitokset, jotka hyödyntävät teollisuuden hiilihydraatti-, lähinnä tärkkelyspitoisissa sivuvirtoja sekä yksi Bionolix-laitos (Hämeenlinnassa), joka käyttää erilliskerättyjä kotitalouksien, kauppojen ja teollisuuden biojätteitä. Esimerkki Etanolix-laitoksesta on Lahdessa toimiva Hartwallin tehtaanseen integroitu laitos. (St1 2010).

5.2 Biokaasu

Biokaasu koostuu tyypillisesti metaanista (CH₄), hiilidioksidista (CO₂), vedystä (H₂), rikkivedystä (H₂S) ja ammoniakista (NH₃). Näistä metaani ja hiilidioksidi ovat suurimmat komponentit ja muita on vain vähäisen. Metaani on itsessään helposti palava kaasu, joka on hiilidioksidia huomattavasti haitallisempi kasvihuonekaasu (Ilmasto.org, 2011) ja jota voidaan helposti käyttää energiantuotantoon. Metaanin palamisreaktio on seuraava: $\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 192 \text{ kcal/mol}$. (Cheng 2010, 152-153.)

5.2.1 Biokaasun tuotanto

Biokaasua tuotetaan kasveista, eläinperäisistä jätteistä, viljoista, kotitalouksien ja teollisuuden biojätteistä sekä märkälietteistä. Sitä valmistetaan anaerobisella mädättämisellä, joka käyttää hyödyksi raaka-aineen luonnollista hajoamista eri bakteerien vaikutuksesta. Tämä bakteerien anaerobinen toiminta sisältää monimutkaisia fysikaalis-kemiallisia ja biologisia prosesseja. (Fulekar 2010, 69.)



Kuvio 5 Anaerobinen hajoaminen (Cheng 2010, 155.)

Anaerobinen hajoaminen tapahtuu neljässä eri vaiheessa. Nämä vaiheet ovat: hydrolyysi, asidogeneesi, asetogeneesi ja metanogeneesi. Biokaasuntuotannon eri vaiheet ovat esitettynä kuviossa 5.

1. Hydrolyysissä alkuperäinen orgaaninen jäte, joka sisältää useita eri kokoisia, isojaakin molekyylejä, kuten hiilihydraatteja, proteiineja, selluloosaa ja lipideitä, hydrolysoidaan. Tämä vaihe on inhibitiolle vastustuskykyinen. Hydrolyysistä vapautuu noin 75 % pieniä molekyylejä kuten sokereita, noin 20 % asetaattia ja noin 5 % vetyä.
2. Asidogeneesi vaiheessa rasvahapot, sokerit ja aminohapot fermentoidaan ja anaerobisesti hapetetaan välituotteiksi, kuten haihtuviksi rasvahapoiksi (VFA). Kuten hydrolyysivaiheessakin osa lähtöaineista muuntuu asetaatiksi, vedyksi ja hiilidioksidiksi.
3. Asetogeenissä välituotteet pilkotaan täysin asetaatiksi, vedyksi ja hiilidioksidiksi.
4. Metanogeenissä metanogeeniset bakteerit tuottavat asetaatista, hiilidioksidista ja vedystä metaania. Asetaatin ja vedyn biokemialliset reaktioyhtälöt metaaniksi ovat seuraavat:

$$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$$
 ja

$$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2.$$
 (Cheng 2010, 154.)

5.2.2 Biokaasun energiasisältö

Biokaasun energiasisältöön vaikuttaa metaanipitoisuus. Metaanin lämpöarvo on $9,9 \text{ kWh/m}^3$ ja sen osuus biokaasusta on noin 55-75 %. Tällöin saadaan energiaa biokaasusta $4\text{--}7 \text{ kWh/m}^3$ ja se vastaa noin puolta litraa bensiiniä. (Hatsala ym. 2004, 20.) 1 m^3 metaania puolestaan vastaa energiasisällöltään n. 1,13 litraa bensiiniä.

6 ETANOLIFERMENTOINTIKOE

Työssä käytetty raaka-aine oli rehumaisia, jossa oli mukana maissin biomassaa. Maissi oli kasvatettu Helsingin yliopiston koeviljelmillä Viikissä ja tässä työssä käytettiin 3 erilaista maissinäytettä. Maissin säilyvyyden parantamiseksi osaa maisseista oli käsitelty ennen pakastamista muurahais-
hapolla ja osan oli annettu muodostaa luonnollisesti orgaanisia happoja. Osa maissista oli pakastettu tuoreena. Luonnollisesti säilöttyä osaa säilöttiin 8 kuukautta. Fermentointikoe toteutettiin panoskokeena samanaikaisella sakkarifikaatiolla ja fermentoinnilla (SSF = Simultaneous Saccharification and Fermentation). Maisseille tehtiin entsymaattisen hydrolyysin josta jatkettiin fermentointia. Fermentointia ennen että sen jälkeen suoritettiin useita analyyseja, kuten ligniinin ja sokereiden määritykset. Fermentoinnista saatava jäännös pakastettiin ja siitä määritettiin metaanipotentiaali.

6.1 Materiaalit ja menetelmät

Fermentoinnissa käytettiin 500 ml:n muovisia pakastuspulloja joihin laitettiin vesilukot. Vesilukot kiinnitettiin silikoniliimalla pakastuspullojen korkkeihin. Kuvassa 7 on fermentoinnissa käytetty pakastuspullo vesilukkoineen ja näytteineen.



Kuva 7 Fermentoinnissa käytetty pakastuspullo ja huonosti sekoittunut näyte eli muodostunut hiilidioksidi on nostanut näytteen kiintoainetta pintaan

6.1.1 Maissi

Työssä tutkittiin kolmella eri tavalla käsiteltyjä ja säilöttyjä maisseja. Maissi MF tarkoittaa tuoretta maissia, M0 tarkoittaa luonnollisesti happoja muodostamalla säilöttyä (8 kk) maissia ja MFA tarkoittaa muurahaishappolla säilöttyä (8 kk) maissia. Kaikki maissit ovat joko tuoreena tai happolisäyksen muodostuksen jälkeen pakastettuja. Luonnollisesti hapot muodostama maissi oli 8 kuukautta säilöttyä ennen pakastamista.

6.1.2 Entsyymit ja hiiva

Entsyyminen hydrolyysi toteutettiin osittain ennen varsinaista EtOH - käsittelyä ja osittain samanaikaisesti EtOH -käsittelyn aikana eli SSF. Entsyymit lisättiin siten, että puolet entsyymeistä ennen EtOH -käsittelyä ja puolet EtOH -käsittelyyn. Entsyymit kokeessa olivat Novozymin entsyymit eli β -glukosidaaseja sekä Celluclastin entsyymit sellulaasi- ja hemisellulaasiseosta. Novozymin entsyymiaktiivisuus oli 8451 FPU/ml (Filter paper unit eli entsyymimäärä, joka vapauttaa 1 μ mol pelkistäviä sokereita suodatinpaperista) ja Celluclastilla 74,7 FPU/ml. Niiden haluttu aktiivisuus käsittelyyn oli Novozymin osalta 500 FPU/ g kuiva-ainetta ja Celluclastin osalta 10 FPU/g kuiva-ainetta, joten niitä lisättiin 400ml:n fermentointipulloihin Novozymeä 1,183 ml ja Celluclastia 2,677 ml.

Fermentoinnissa käytettiin normaalia kaupan leivinhoivaa *Saccharomyces cerevisiae*. Sillä on korkea etanoli-, happo- ja suolatoleranssi, joten sen käyttö fermentointiin oli tässä kokeessa hyvin perusteltua. *Saccharomyces cerevisiae*-hiiva on käytetty etanolia tuottava hiivalaji.

6.1.3 Esikäsittelyt

Ensimmäisenä esikäsittelynä oli pakastettujen näytteiden saksiminen pienemmäksi. Seuraavaksi ennen fermentointia toteutettiin entsyymattainen hydrolyysi 50 °C:ssa inkubaattorissa 3h kierrosnopeudella 150 rpm. Entsyymattisessa hydrolyysissä maississa olevat pitkäketjuiset selluloosat ja hemiselluloosat pyrittiin depolymerisoimaan sokereiksi kuten glukooksi. Sokerit toimivat fermentoinnissa hiivan ravintona. Esikäsittelyyn lisättiin puolet koko lisättävien entsyymien määristä. Fermentoinnin esikäsittelyn toteutus on kuvattu tarkemmin liitteessä 1.

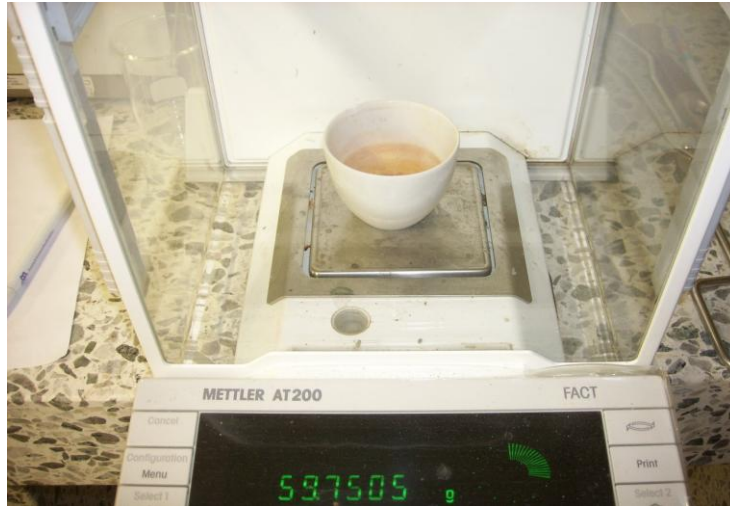
6.2 Analyysit

Analyysit toteutettiin ennen ja jälkeen fermentoinnin. Fermentointia ennen mitattiin ligniinin ja pelkistävien sokereiden määrät happohydrolyysillä työhöjeen mukaan. Myös tehtiin TS/VS määrittely.

6.2.1 TS/VS määrittely

Kuiva-aine eli TS ja orgaaninen kuiva-aine eli VS määrittelyllä analysoitiin kuiva-aineen, orgaanisen aineen ja tuhkan määrät maissista. TS ja VS tietoja kerättiin suoraan raaka-aineista, syötteistä etanoliprosesseihin sekä

lopputuotteesta. Tiedoista voidaan laskea TS ja VS -reduktio eli kuinka paljon prosessit kuluttavat kuiva- ja orgaanista ainesta. TS/VS määrittäminen toteutettiin aluksi taaraamalla upokkaita hehkutusuunissa 550 °C:ssa kaksi tuntia ja edettiin SFS 3008:n mukaan. TS/VS -määrittämisen punnitusvaiheesta on kuva 8.



Kuva 8 Punnitus TS/VS -määrittämiseen

6.3 Toteutus

Esikäsittelyjen jälkeen aloitettiin fermentointikoe. Bioetanolin tuottamiseen käytettiin osittain SSF -menetelmää (Simultaneous Saccharification and fermentation) eli puolet entsyymeistä lisättiin vasta fermentoimisvaiheeseen. Liitteessä 2 on entsyymien lisätyt määrät ja toteutus. Typetyksen tarkoituksena oli poistaa happea. Pulloja punnittiin tietyin väliajoin muodostuneen etanolin määrän laskemiseksi. Kuvassa 9 on fermentointikokeessa käytetyt pulloet sisältöineen inkubaattorissa.



Kuva 9 Fermentointipullot inkubaattorissa 50°C:ssa hydrolyysivaiheessa.

7 METAANINTUOTTOKOE

Metaanintuottokoe suoritettiin Bioprocess Control -laitteistoilla. Metaanintuottokokeeseen käytettiin raaka-aineena etanolifermentoituja- sekä fermentoimattomia maisseja. Koe suoritettiin panoskokeena ja kokeessa käytettiin ympäristönä Paroisten jätevedenpuhdistamon mädättämölietettä. Bioprocess Control -laitteistoista on kuva 10.



Kuva 10 Bioprocess Control -laitteistot

7.1 Materiaalit ja menetelmät

Bioprocess Control -laitteistoon kuuluvat näytepullot ($V=500\text{ml}$), kaasujen pesupullot, kaasukennot sekä tulokset kirjaavat tietokoneet AMPTS -ohjelmistolla. Laitteistot kirjaavat tulokset automaattisesti kaasukennojen tilavuuden mukaan, kun ne täyttyvät. Kaasukennojen tilavuudet vaihtelevat 12 ja 14 ml:n välillä.

7.1.1 Raaka-aineet

Raaka-aineina käytettiin tässä työssä fermentoituja maisseja. Myös maisia suoraan pellolta pakastettuna, luonnollisesti säilöttynä sekä muurahais-
hapolla säilöttynä käytettiin raaka-aineina panoskokeissa. Ympäristönä kokeessa käytettiin Paroisten jätevedenpuhdistamolta 2.5.2011 haettua lietettä, jota nälkiinnytettiin kaksi päivää.

7.1.2 Esikäsittelyt

Esikäsittelyinä metaanintuottokokeisiin voidaan pitää etanolifermentointia eri vaiheineen sekä rotavaporointia. Rotavaporoinnilla pyrittiin saamaan etanoli pois raaka-aineesta. Rotavaporointilaitteisto on kuvassa 11.



Kuva 11 Rotavaporointi –laitteisto

Rotavaporoinnissa käytettiin lämpötilana noin 80°C. Rotavaporoinnista saadun etanolin määrää on kuitenkin mahdoton sanoa, koska osa etanolista jäi rotavaporin sisäpinnoille. Taulukossa 2 on esitetty rotavaporoidulle etanolille tehdyn happomäärityksen tulokset, josta selviää, ettei happoja juurikaan poistunut rotavaporoinnissa.

Taulukko 2 Rotavaporoidun etanolin happomääritys

	oksaalihappo	muurahaishappo	omenahappo	maitohappo	etikkahappo
M0 etanoli	0	0	0	0	1 %
MFA etanoli	0	0	0	0	1 %
MF etanoli	0	0	0	0	1 %

7.1.3 Analyysit

Metaanintuottokoetta ennen tehtiin näytteille kuiva-ainepitoisuusmääritykset. Näiden tulosten mukaan pystyttiin laskemaan näytteen määrät prosesseihin, jotta saatiin näytteen ja ympin määrät testitiin sopiviksi. Myös metaanintuottokokeen jälkeen mitattiin happo- ja sokeripitoisuudet. Liitteessä 2 on esitetty näytepulloihin lisätyt määrät ja TS/VS -pitoisuudet.

7.2 Toteutus

Metaanintuottokoetta varten 500 ml:n testipulloihin punnittiin näyte, vesi tai sitruunahappo ja ympä. Pulloihin punnittiin sekä fermentoimattomia, että fermentoituja näytteitä. Myös pelkkää sitruunahappoa punnittiin kolmeen pulloon, jotta saatiin laskettua sen vaikutukset metaanintuottoon tuloksista pois. Punnitukset toteutettiin nopeasti, jotta hajoamisreaktiot käynnistyivät kaikissa koepulloissa mahdollisimman samanaikaisesti. Nollanäytteeksi punnittiin pelkkä ympä, jotta myös sen vaikutus tuloksiin saatiin laskettua pois. Kaikkien pullojen sisältöjen kokonaistilavuudet olivat 400 ml.

Punnitusten jälkeen kaikki pulloet tyytettiin, suljettiin ja asetettiin vesihautteeseen, jonka lämpötila oli 37 °C. Pulloet liitettiin laitteistoon kaasuletkuilla. Laitteisto mittasi kaasunmuodostumista 30 päivän ajan.

8 KOETULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Kokeista saaduista tuloksista laskettiin etanolin ja metaanin tuottomäärät ja energiatuotot. Tuloksia saatiin etanolintuottokokeissa punnituista pulloista sekä kulutetuista sokereista ja metaanintuottokokeissa tuotetuista kaasumääristä.

8.1 Fermentointi

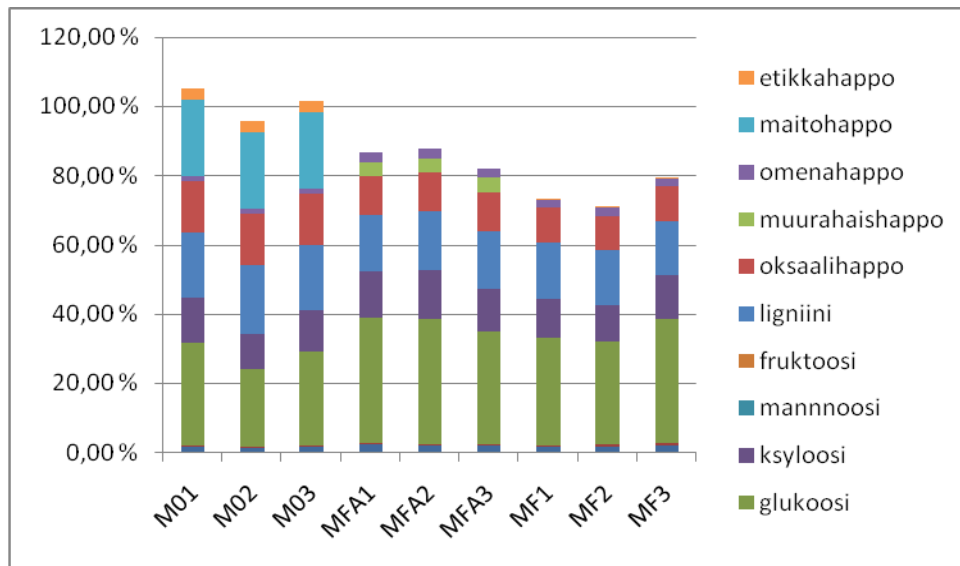
Fermentoinnissa muodostunutta etanolia mitattiin pullojen painojen vähenemisenä sekä happohydrolyyseillä mitattujen kulutettujen sokereiden vähenemisenä. Pullojen painot oletettiin vähenevän muodostuneen hiilidioksidin verran, joka on verrannollinen muodostuneen etanolin määrään suhteessa hiilidioksidin paino $\times 1,083$. Tuotetun etanolin laskenta kulutettujen sokereiden määrällä toteutuu yhtälöllä $1 \text{ mol glukosia} \rightarrow 2 \text{ mol CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2 \text{ mol CO}_2$; ja molekyylipainoina: $180 \rightarrow 2 \times 46 + 2 \times 44$.



Kuva 12 Vasemmalla puolella vielä fermentoituva pullo ja oikealla puolella fermentoitumisen jo lopettanut pullo

8.1.1 Näytteiden koostumus ennen fermentointia

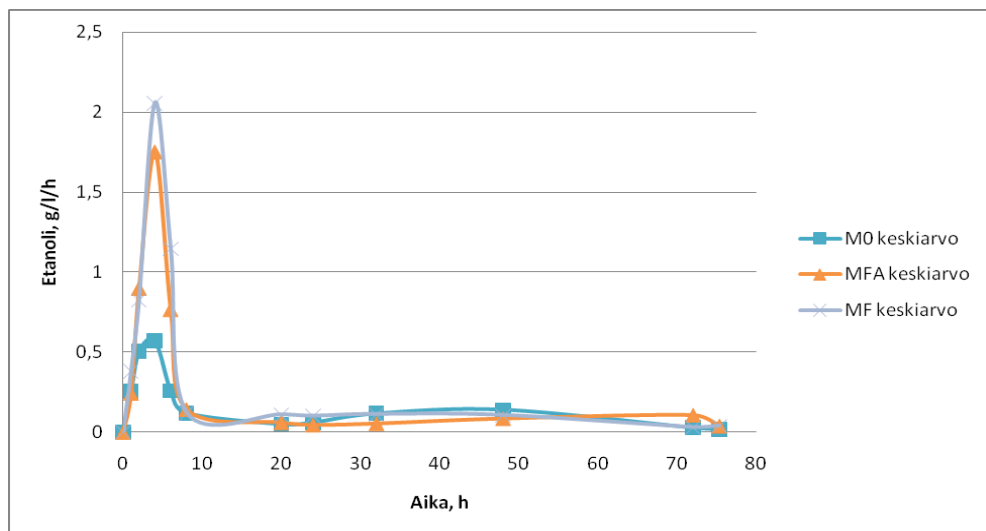
Näytteiden kuiva-aineen koostumus mitattiin ennen fermentointia. Näytteiden koostumus on esitettyä kuviossa 6.



Kuvio 6 Näytteiden koostumus % kuiva-aineesta

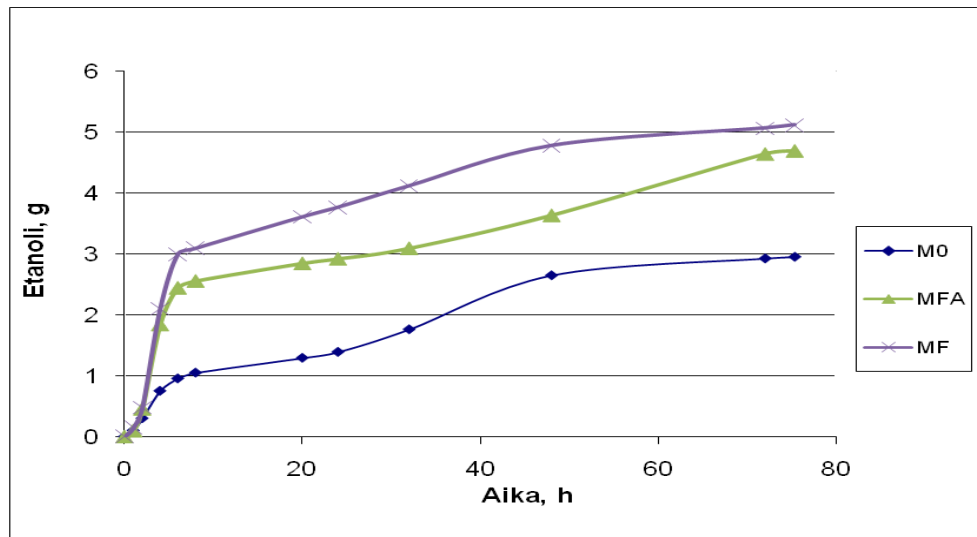
8.1.2 Maissi tuore

Tuoreesta maissista saatiin muodostettua etanolia hyvin ja rinnakkaiset näytteet olivat vastaavia. Etanolin tuotossa on havaittavissa eksponentiaalisen kasvun vaihe, jossa oletettavasti vapaita sokereita on enemmän. Hidas- tai kylläisyvaiheessa entsyymit pilkkovat sokereita tasaisella nopeudella hiivan käyttöön. Kuviossa 7 on esitettyä etanolin tuottonopeudet keskiarvoina.



Kuvio 7 Etanolin tuottonopeudet keskiarvoina

Tuoretta maissia fermentoitaessa muodostui etanolia noin 5g/ koepullo (kuvio 8). Tämä määrä on kokonaistilavuudesta noin 1,7 %, syötetystä kuiva-aineesta noin 31,0 % ja koko näytemäärästä noin 4,0 %. Liitteessä 1 on koepullojen sisältämät kuiva-aine ja näytemäärät.



Kuvio 8 Muodostunut etanoli näytteistä punnitustuloksista

Etanolintuottokokeiden alussa oli sokeripitoisuus C6 sokereiden ja fruktoosin osalta noin 32 % ja kokeiden jälkeen noin 11 %. Näistä laskettaessa teoreettinen tuottopotentiali on vain 3,3g etanolia/ koepullo, joten punnitut tulokset ovat suuret siihen nähden. Taulukossa 3 ja 4 on esitettyä sokereiden osuudet ennen ja jälkeen fermentoinnin sekä taulukossa 5 on esitetty niiden vähentymä. Taulukossa 6 on esitettyä tuotetut etanolimäärät.

8.1.3 Maissi säilötty

Säilötystä maissista saatiin etanolia muodostettua hyvin ja rinnakkaiset näytteet olivat vastaavia. Etanolin tuotossa on havaittavissa eksponentiaalisen kasvun vaihe, jossa oletettavasti vapaita sokereita on enemmän. Hidasvaiheessa entsyymit pilkkovat sokereita tasaisella nopeudella hiivan käyttöön. Uusi nousu tuotossa selittyy hiivan aktiivisuuden romahtamisella sokereiden nopean loppumisen jälkeen sekä säilönnässä muodostuneiden happojen inhiboivalla vaikutuksella. Kuviossa 7 on esitettyä etanolin tuottonopeus säilötystä maissista.

Säilöttyä maissia fermentoitaessa muodostui etanolia noin 2,8g/ koepullo (kuvio 8). Tämä määrä on kokonaistilavuudesta noin 0,9 % ja syötetystä kuiva-aineesta noin 15,9 %. Liitteessä 1 on koepullojen sisältämät kuiva-aine ja näytemäärät.

Etanolintuottokokeiden alussa oli sokeripitoisuus C6 sokereiden ja fruktoosin osalta noin 26 % ja kokeiden jälkeen noin 17 %. Näistä laskettaessa teoreettinen tuottopotentiali on vain 0,7g etanolia/ koepullo, joten punnitut tulokset ovat suuret siihen nähden. Taulukossa 3 ja 4 on esitettyä sokereiden osuudet ennen ja jälkeen fermentoinnin sekä taulukossa 5 on esitetty niiden vähentymä. Taulukossa 6 on esitettyä tuotetut etanolimäärät.

8.1.4 Muurahaishapolla säilötty maissi

Muurahaishapolla säilötystä maissista saatiin etanolia muodostettua hyvin ja rinnakkaiset näytteet olivat vastaavia. Etanolin tuotossa on havaittavissa eksponentiaalisen kasvun vaihe, jossa oletettavasti vapaita sokereita on enemmän. Hidastuneessa vaiheessa entsyymit pilkkovat sokereita tasaisella nopeudella hiivan käyttöön. Kuviossa 7 on esitettyä etanolin tuottonopeus muurahaishapolla säilötystä maissista.

Muurahaishapolla säilöttyä maissia fermentoitaessa muodostui etanolia noin 4,7g/ koepullo (kuvio 8). Tämä määrä on kokonaistilavuudesta noin 1,5 % ja syötetystä kuiva-aineesta noin 25,4 %. Liitteessä 1 on koepullojen sisältämät kuiva-aine ja näytemäärät.

Etanolintuottokokeiden alussa oli sokeripitoisuus C6 sokereiden ja fruktoosin osalta noin 34 % ja kokeiden jälkeen noin 14 %. Tämä osoittaa, että C6-sokeria on edelleen sitoutuneena selluloosaan. Kulutetuista sokereista laskettaessa teoreettinen tuottopotentiaali on vain 1,3g etanolia/ koepullo, joten punnitut tulokset ovat suuret siihen nähden. Taulukossa 3 ja 4 on esitettyä sokereiden osuudet ennen ja jälkeen fermentoinnin sekä taulukossa 5 on esitetty niiden vähentymä. Taulukossa 6 on esitettyä tuotetut etanolimäärät.

Maissin yhdistetty bioetanoli- ja biokaasutuotanto

Taulukko 3 Sokereiden osuudet ennen fermentointia % kuiva-aineesta

	ara	gal	glc	xyl	man	fru	summa
M01	1,55 %	0,35 %	29,64 %	13,04 %	n.d. *)	n.d.	44,59 %
M02	1,18 %	0,29 %	22,38 %	10,35 %	n.d.	n.d.	34,19 %
M03	1,52 %	0,40 %	26,97 %	12,05 %	n.d.	n.d.	40,93 %
MFA1	2,07 %	0,49 %	36,34 %	13,48 %	n.d.	n.d.	52,38 %
MFA2	1,85 %	0,41 %	36,00 %	14,48 %	n.d.	n.d.	52,74 %
MFA3	1,71 %	0,47 %	32,76 %	12,11 %	n.d.	n.d.	47,05 %
MF1	1,56 %	0,40 %	31,12 %	11,29 %	n.d.	n.d.	44,37 %
MF2	1,60 %	0,48 %	29,70 %	10,54 %	n.d.	n.d.	42,31 %
MF3	1,89 %	0,50 %	35,97 %	12,80 %	n.d.	n.d.	51,17 %
*) not detected (ei havaittu)							

Taulukko 4 Sokereiden osuudet fermentoinnin jälkeen % kuiva-aineesta

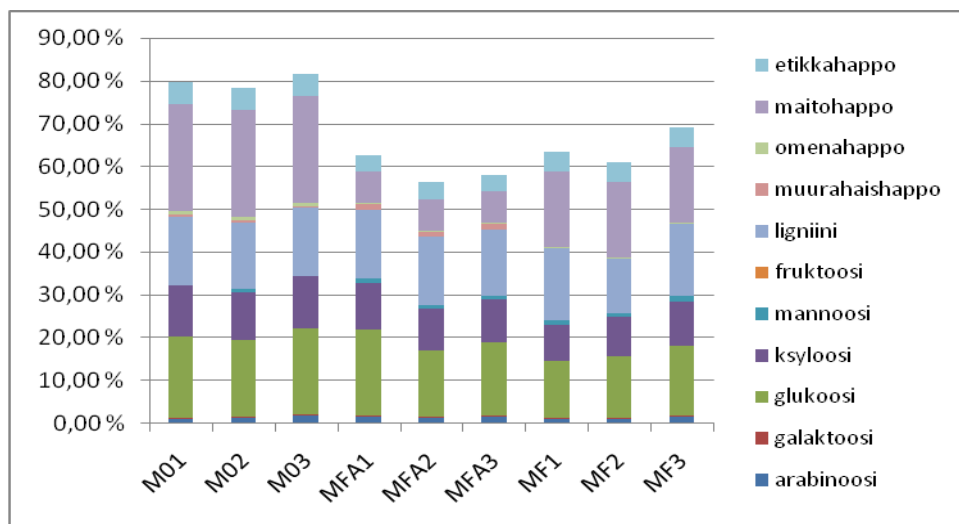
	ara	gal	glc	xyl	man	fru	summa
M01	1,01 %	0,03 %	16,90 %	10,51 %	n.d. *)	n.d.	28,46 %
M02	1,07 %	0,17 %	15,94 %	9,83 %	0,73 %	n.d.	27,75 %
M03	1,36 %	0,23 %	17,99 %	10,78 %	n.d.	n.d.	30,37 %
MFA1	1,20 %	0,16 %	15,73 %	8,49 %	0,91 %	n.d.	26,48 %
MFA2	0,91 %	0,10 %	12,12 %	7,69 %	0,64 %	n.d.	21,46 %
MFA3	1,03 %	0,17 %	13,47 %	7,84 %	0,70 %	n.d.	23,22 %
MF1	0,74 %	0,09 %	9,35 %	5,93 %	0,70 %	n.d.	16,82 %
MF2	0,73 %	0,09 %	10,08 %	6,47 %	0,60 %	n.d.	17,96 %
MF3	0,96 %	0,18 %	11,54 %	7,28 %	0,79 %	n.d.	20,76 %
*) not detected (ei havaittu)							

Taulukko 5 Sokereiden vähentymät fermentoinnissa % kuiva-aineesta

	ara	gal	glc	xyl	man	fru	summa
M01	0,54 %	0,32 %	12,74 %	2,54 %	0,00 %	0,00 %	16,13 %
M02	0,11 %	0,12 %	6,43 %	0,52 %	-0,73 %	0,00 %	6,45 %
M03	0,16 %	0,16 %	8,97 %	1,27 %	0,00 %	0,00 %	10,57 %
MFA1	0,87 %	0,33 %	20,61 %	5,00 %	-0,91 %	0,00 %	25,90 %
MFA2	0,93 %	0,31 %	23,88 %	6,80 %	-0,64 %	0,00 %	31,28 %
MFA3	0,68 %	0,30 %	19,29 %	4,26 %	-0,70 %	0,00 %	23,83 %
MF1	0,82 %	0,31 %	21,76 %	5,36 %	-0,70 %	0,00 %	27,55 %
MF2	0,87 %	0,38 %	19,62 %	4,07 %	-0,60 %	0,00 %	24,35 %
MF3	0,93 %	0,33 %	24,43 %	5,52 %	-0,79 %	0,00 %	30,41 %

8.1.5 Näytteiden koostumus fermentoinnin jälkeen

Näytteiden kuiva-aineen koostumus mitattiin fermentoinnin jälkeen, ennen metaanintuottoa. Fermentoinnissa kului ainoastaan helppoja sokereita, kuten glukoosia EtOH -tuottoon. Kuviossa 9 on esitetty näytteiden koostumus fermentoinnin jälkeen.



Kuvio 9 Näytteiden koostumus fermentoinnin jälkeen

8.1.6 Tulokset fermentoinnista

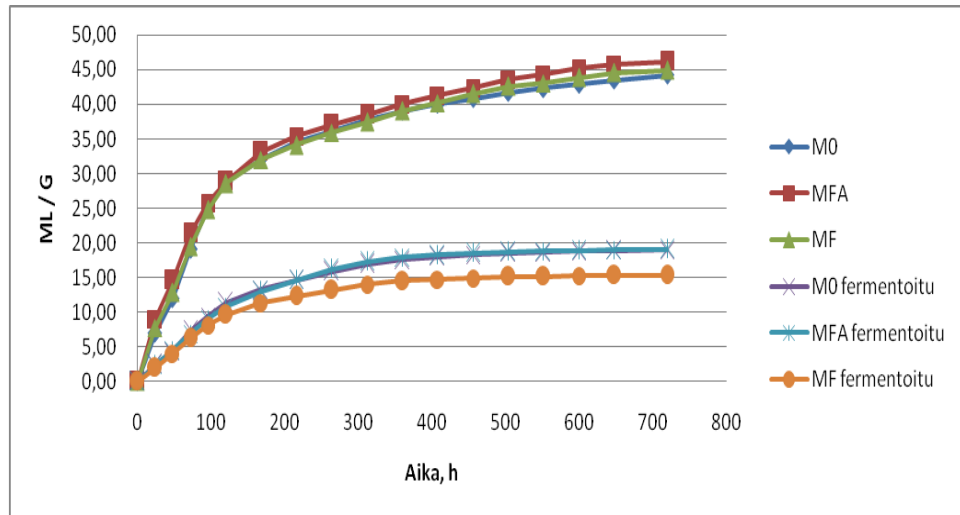
Fermentoinnista kerättiin tulokset kahdella eri tavalla; punnitsemalla sekä kulutettujen sokereiden kautta. Taulukossa 6. on esitetty fermentoinnin tulokset ja verrattu niitä teoreettisiin tuloksiin. Teoreettinen EtOH on laskettu C6 -sokereiden määrästä näytteessä eli teoreettinen EtOH = näyte (20g) * C6 -sokerit % * potentiaalinen EtOH -tuotto, esim. M0 = 20g*26%*0,51 = 2,7g.

Taulukko 6 Fermentoinnin tulokset ja vertaus teoreettiseen

	M0	MF	MFA
C6 sokerit ja fruktoosi ennen fermentointia	26 %	32 %	34 %
C6 sokerit ja fruktoosi fermentoinnin jälkeen	17 %	11 %	14 %
EtOH kulutetuista sokereista, g	0,71	1,28	1,32
EtOH punnituista tuloksista, g	3,0	5,1	4,7
Teoreettinen EtOH näytteestä, g	2,7	3,3	3,5
Mitattu EtOH	0,7	1,1	1,2
Punnittu EtOH / teoreettinen tuotto	111 %	157 %	135 %
Mitattu EtOH / teoreettisen tuotto	10 %	22 %	18 %
Kulutetut sokerit EtOH / teoreettinen tuotto	27 %	39 %	38 %

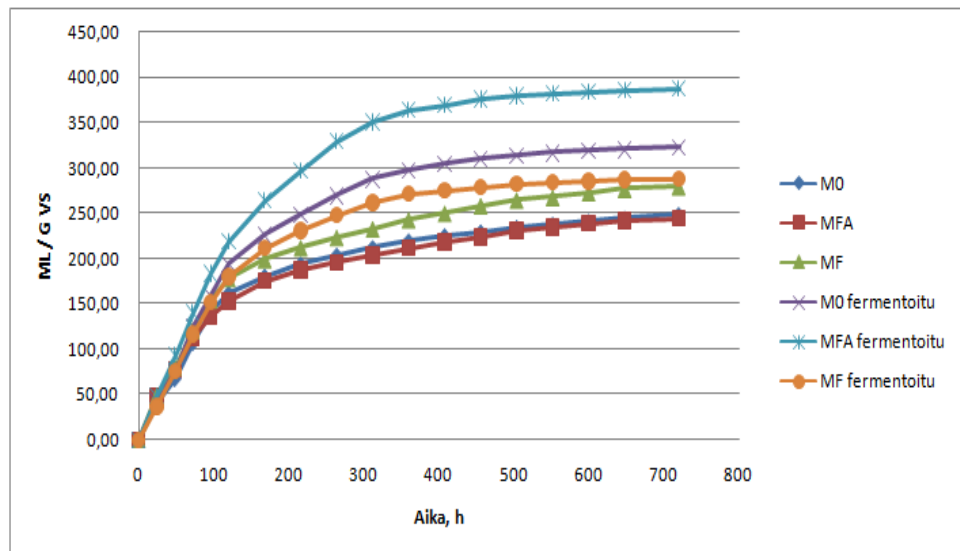
8.2 Metaani

Metaanintuottokokeen tulokset on kerätty 30 päivän ajalta. Liitteessä 3 on esitettynä metaanin tuotot eri panoskoepullojen osilta. Kuviossa 10 on metaanin tuotot keskiarvoina jokaista näyte grammaa kohti.



Kuvio 10 Keskiarvot ml tuotettua metaania näyte g kohti

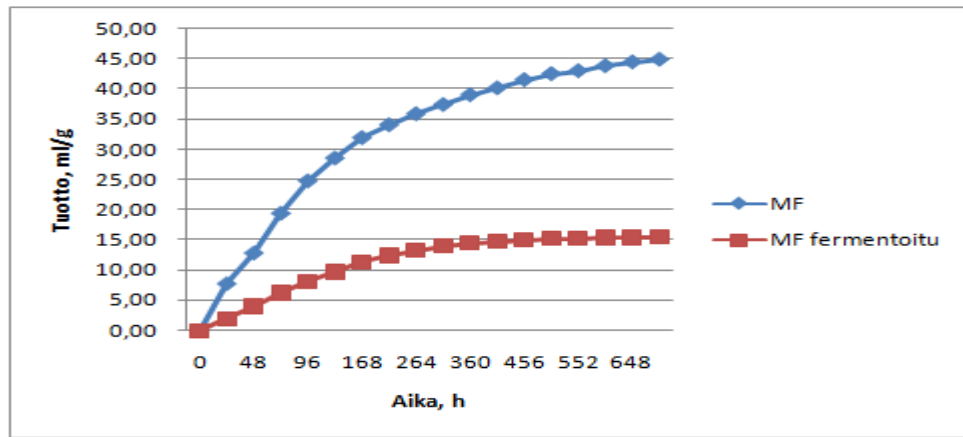
Kuviossa 11 on esitetty metaanin tuotot jokaisen näytteen orgaanista kuiva-ainetta kohti.



Kuvio 11 Keskiarvot tuotetusta metaanista jokaisen näytteen VS kohti

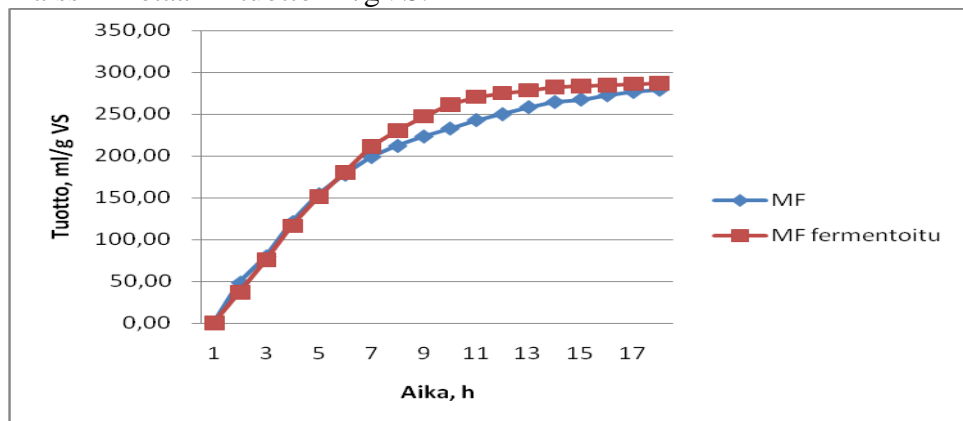
8.2.1 Maissi tuore

Tuore maissi tuotti metaania hyvin ja tulokset olivat vastaavia. Tuoreen maissin osalta on kuviossa 12 esitettynä metaanintuotto ml/g ilman esikäsittelyä toiminutta fermentointia sekä fermentoidun osalta.



Kuvio 12 Tuoreen-, sekä tuoreen fermentoidun maissin metaanintuotto ml/g

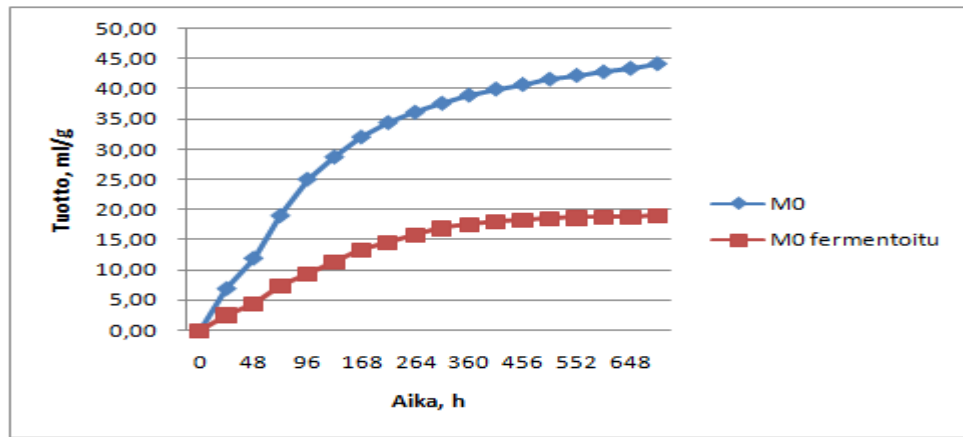
Kuviossa 13 on esitettyä tuoreen maissin sekä fermentoidun tuoreen maissin metaanin tuotto ml/gVS.



Kuvio 13 Tuoreen maissin metaanintuotto ml/g VS

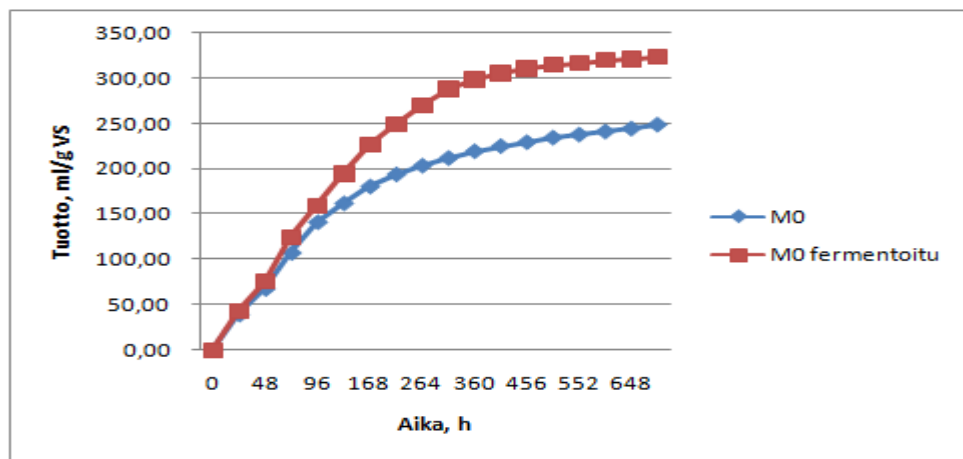
8.2.2 Maissi säilötty

Säilötyn maissin metaanintuotto pysähtyi pullolla 5 huomattavasti aikaisemmin ja alemmalle tasolle kuin muilla pulloilla. Säilötyn fermentoidun maissin osalta pullon 35 metaanintuotto nousi toisia korkeammalle tasolle. Muutoin tulokset säilötyn maissin osalta ovat hyviä ja toisiaan vastaavia. Kuviossa 14 on esitettyä säilötyn maissin sekä fermentoidun säilötyn maissinmetaanintuotto ml/g.



Kuvio 14 Säilötyn maissin sekä fermentoidun säilötyn maissin metaanintuotto ml/g

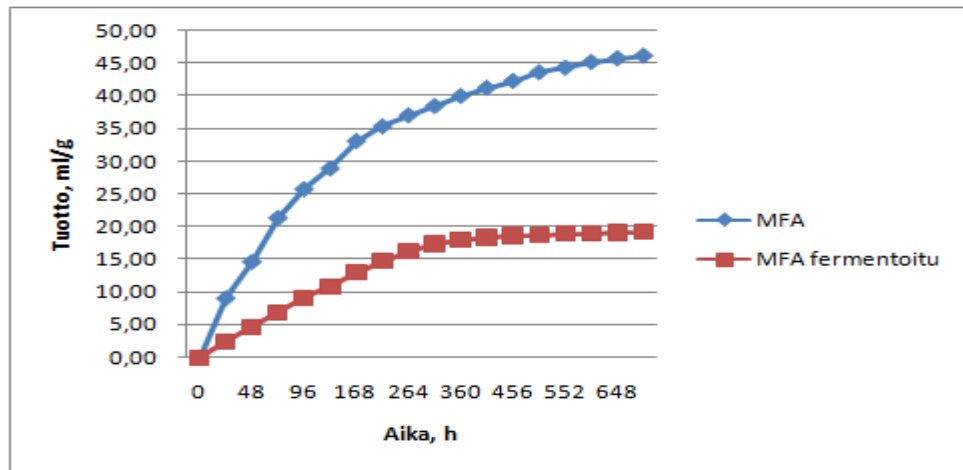
Kuviossa 15 on esitettyä säilötyn maissin sekä fermentoidun säilötyn maissin metaanintuotto ml/gVS.



Kuvio 15 Säilötyn maissin metaanintuotto ml/g VS

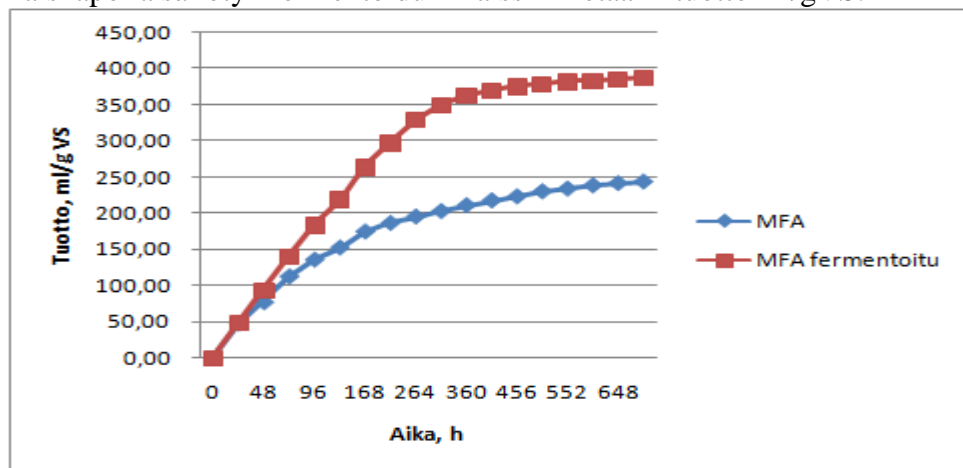
8.2.3 Muurahaishapolla säilötty maissi

Muurahaishapolla säilötyn maissin metaanintuotot olivat hyvät ja toisiaan vastaavat. Muurahaishapolla säilötyn maissin sekä muurahaishapolla säilötyn fermentoidun maissin metaanintuotto ml/g on esitettyä kuviossa 16.



Kuvio 16 Muurahaishapolla säilötyn maissin metaanintuotto ml/g

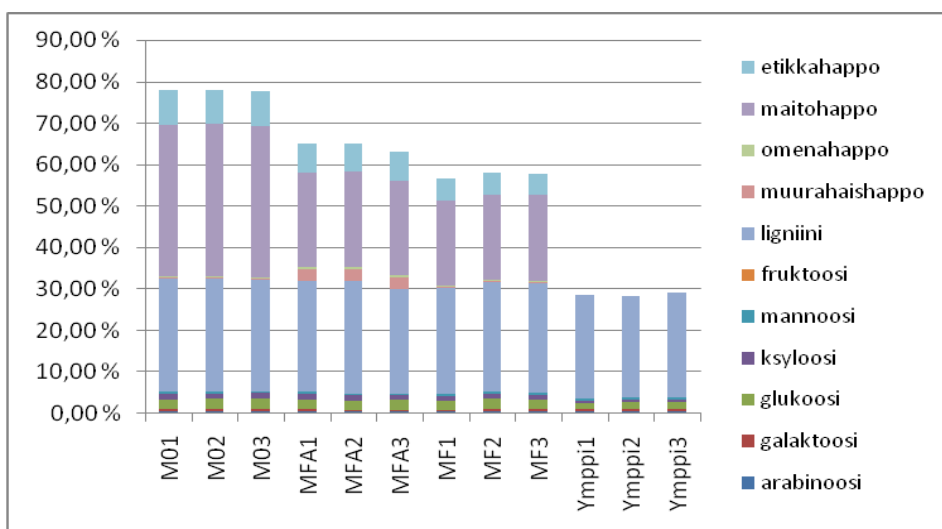
Kuviossa 17 on esitettyä muurahaishapolla säilötyn maissin sekä muurahaishapolla säilötyn fermentoidun maissin metaanintuotto ml/gVS.



Kuvio 17 Muurahaishapolla säilötyn maissin metaanintuotto ml/g VS

8.2.4 Näytteiden koostumus metaanintuoton jälkeen

Näytteiden koostumus mitattiin fermentoinnin ja metaanintuottokokeen jälkeen. Biometaanintuotossa kului kaikki helposti käsiteltävät aineet. Jäljelle jäi vielä ligniini sekä happoja. Kuviossa 18 on esitetty näytteiden koostumus fermentoinnin ja metaanintuoton jälkeen.



Kuvio 18 Näytteiden koostumus fermentoinnin ja metaanintuottokokeen jälkeen sekä ympin koostumus % kuiva-aineesta

8.3 Tuottovertailu

Fermentoinnissa tuotettiin etanolia taulukon 7 mukaisesti joko punnituk-sella saadut määrät tai laskennallisesti kulutettujen sokerien tuotetut mää-rät. Punnituksen kautta lasketut etanolintuotot olivat hyvin suuret verrattu-na kulutettujen sokereiden kautta laskettuun etanolintuottoon.

Taulukko 7 Etanolin tuotot sekä punnitustuloksista että kulutetuista sokereista laskettuna

Laskentatapa	Näyte	EtOH tuotto g
punnitus	M0	2,8
kulutetut sokerit	M0	0,9
punnitus	MF	5,1
kulutetut sokerit	MF	1,7
punnitus	MFA	4,7
kulutetut sokerit	MFA	1,7

Tulokset osoittivat metaanintuoton ml/g VS kasvavan fermentoidulla muurahaishapolla säilötyn maissin osalta sekä hieman myös fermentoidul-la säilötyllä maissilla verrattuna niiden fermentoimattomiin näytteisiin. Tuoreella maissilla sekä fermentoidulla tuoreella maissilla ei ollut juuri-kaan eroa metaanintuotoissa. Taulukossa 8 on esitettyä metaanintuotot kaikkien näytteiden osalta ml/gVS ja ml/g näytettä.

Taulukko 8 Metaanintuotot

Näyte	Metaania ml/g VS	Metaania ml/g näytettä
M0	248	44
MFA	244	46
MF	279	45
M0 EtOH	323	2
MFA EtOH	387	19
MF EtOH	287	15

8.4 Energia-arvot

Energia-arvot laskettiin kilowattitunneissa kiloa kuiva-ainetta kohti ja las-
kuissa huomioitiin fermentoinnin vaikutus kuiva-aineeseen. Kokonaistuo-
tot on esitettyinä sekä punnitusten että sokerien kulutuksien kautta lasket-
tuna taulukossa 9. Taulukossa 9 on esitettyä myös metaanin tuotto pelkis-
tä raaka-aineista sekä energian tuotto hehtaaria kohti. Maissin satoisuus on
15000 kg ka/ha (Pakarinen 2011).

Taulukko 9 Energiantuotot

	EtOH kWh/kgTS	Metaani kWh/kgTS	Yhteensä kWh/kgTS	Yhteensä MWh/ha
M0 punnitus	1	0,1	1,1	16,5
M0 kulutetut	0,3	0,1	0,4	6
M0		0,5	0,5	7,5
MF punnitus	1,9	0,1	2	30
MF kulutetut	0,6	0,1	0,7	10,5
MF		0,5	0,5	7,5
MFA punnitus	1,8	0,1	1,9	28,5
MFA kulutetut	0,6	0,1	0,7	10,5
MFA		0,5	0,5	7,5

9 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tuoreen maissin sekä muurahaishapolla säilötyn maissin etanolintuotot olivat luonnollisesti säilöttyä maissia korkeampia, koska luonnollisesti säilötty maissi oli säilömisvaiheessa kuluttanut sokereita happojen muodostukseen.

Etanolifermentoinnin tuloksissa on hyvin paljon epävarmuutta. Kulutettujen sokereiden kautta laskettu tuotto oli paljon pienempi kuin punnitusten kautta laskettu tuotto. Oletuksena on, että punnituksissa on kadonnut enemmän painoa, kuin pitäisi ja että kulutetuista sokereista laskettu etanolituotto antaa oikeamman tuloksen.

Metaanintuottokokeessa maissit käyttäytyivät hyvin samalla tavalla ja säilöntä ei vaikuttanut metaanituottoon minkään näytteen osalta. Metaanin tuotto kuitenkin nousi fermentoinnissa käsiteltyjen näytteiden osilta kuiva-ainetta kohti laskettuna, eli orgaanisen aineen ominaistuotto parani. Fermentointia voidaankin pitää metaanituottoa parantavana esikäsittelynä biokaasutuksessa.

Muurahaishapolla säilötty maissi ja tuore maissi tuottivat lähes yhtä paljon energiaa yhdistetystä prosessoinnista ja luonnollisesti säilötty maissi huomattavasti vähemmän. Kaikkiin näytteisiin jäi vielä energiapotentiaalia fermentoinnin ja metaanin tuoton jälkeen. Loppurejektä voisi mahdollisesti käyttää vielä energian tuotannossa polttamalla.

LÄHTEET

Acquaah, G. 2005. 2. osin uud. p. Principles of Crop Production. New Jersey USA: Pearson Education Inc.

Alèn, R. 2009. Kokoelma orgaanisia yhdisteitä, Ominaisuudet ja käyttökohteet. Jyväskylä, Gummerus kirjapaino Oy.

Arola, H. 2011. VTT tutki: E10-bensiiniä ei kulu sen enempää kuin 98:aa. Helsingin Sanomat 11.5.2011, B4.

Blomqvist, L. 2010. Meta-analyysi muurahaishapon vaikutuksista säilörehun käymislaatuun. Helsingin yliopisto, Kotieläintieteen laitos. Maisterin tutkielma. Viitattu

https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/16179/Gradu_julkaisu_Laura_Blomqvist.pdf?sequence=1

Cheng, J. 2010. Biomass to Renewable Energy Processes. Florida USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Davin, B. & Lewis, N. 2005. Lignin primary structures and dirigent sites. Institute of Biological Chemistry, Washington State University. USA. Viitattu 15.3.2011. http://sbli.ls.manchester.ac.uk/fungi/21st_Century_Guidebook_to_Fungi/RPRINT_collection/Davin_Lewis_lignin_primary_structure.pdf

Fulekar, M.H. 2010. Environmental biotechnology. USA: CRC Press, Science Publishers.

Hakala, K., Hannukkala, A.O., Huusela-Veistola, E., Jalli, M. & Peltonen-Sainio, P. 2011. Agricultural and food science. MTT Agrifood Research Finland. Jokioinen. Viitattu 14.4.2011. <http://www.mtt.fi/afs/pdf/mtt-afs-v20n1p3.pdf>

Hatsala, A & Raimovaara, M. 2004. Biokaasun tuotanto- ja käyttömahdollisuudet Kanta-Hämeessä.

Ilmasto.org; Kaikki ilmastonmuutoksesta. 2011. Viitattu 11.5.2011. <http://www.ilmasto.org/ilmastonmuutos/perusteet/kasvihuonekaasut.html>

Kangas, A & Harmoinen ym., T. 2010. Peltokasvilajikkeet 2010. ProAgria Keskusten liitto. Otavan Kirjapaino Oy, Keuruu.

Kallberg, H. 2011. E10 –bensiinin vaikutuksesta auton polttoaineenkulutukseen. Tieliikenteen Tietokeskus. Viitattu 10.5.2011. www.e10bensiini.fi

Laine, A. 2009. Maissin viljelyn mahdollisuudet ja viljelytekniikka koetustosten valossa. MTT. Luento, ProAgria Pirkanmaa 3.2.2009. Viitattu

9.3.2011.

https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Artturi/Artturikirjasto/Esitelmadiasarijat/Maissinviljely_3.2.2009_AL_Tampere.pdf

Laine, C. 2005. Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. Helsingin yliopisto, Oy Keskuslaboratorio ja KCL. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology.

Laine, R. 2011. Etanolituotantoa Uuteenkaupunkiin. Luento, Bioenergia-alan Toimialapäivät Noormarkku 21.3.-1.4.2011. Viitattu 25.9.2011. <http://www.prizztech.fi/linkkitiedosto.aspx?taso=4&id=709&sid=540>

Maier, R.M., Pepper, I.L. & Gerba, C.P. Environmental microbiology. California USA: Academic Press.

Maissi - taimikasvatus ja hoito. 2009. Viitattu 9.3.2011. <http://www.suomela.fi/maissi-taimikasvatus-ja-hoito.aspx>

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzappe, M. & Ladisch, M. 2004. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. Viitattu 14.3.2011. http://i-farmtools.iastate.edu/ref/Mosier_et_al_2005.pdf

Navetan rakentaminen 2/2007. 2007. Niskanen, H. Viitattu 30.9.2011. <http://ammattilaiset.valio.fi/maitojame/rakentaminen07/mitoita.htm>

Niskanen, P. n.d. Erotustekniikat biojalostamoissa. Lappeenrannan teknillinen yliopisto, Kemianteekniikan osasto. Kandidaatintyö ja seminaari.

Nörgård, J. 2005. Ethanol production from biomass - optimization of simultaneous saccharification and fermentation with respect to stirring and heating, Lund Institute of Technology, Department of Chemical Engineering, Ruotsi. Viitattu 16.3.2011. www.chemeng.lth.se/exjobb/E262.pdf

Pakarinen, A. 2011. Evaluation of annual bioenergy crops in the boreal zone for biogas and ethanol production. University of Helsinki, Department of Food and Environmental Sciences. Väitöskirja.

Pakarinen, A., Maijala, P., Jaakkola, S., Stoddard, F.L., Kymäläinen, M., Viikari, L. 2011. Evaluation of preservation methods for improving biogas production and enzymatic conversion yields of annual crops. Biotechnology for Biofuels. Väitöskirja.

Rättö, M.; Vikman, M. & Siika-aho, M. 2009. Yhdyskuntajätteiden hyötykäyttö biojalostamossa. VTT. Viitattu 30.9.2011. <http://www.vtt.fi/inf/pdf/tiedotteet/2009/T2494.pdf>

Silage making. 2011. UK Agriculture. Viitattu 30.9.2011. http://www.ukagriculture.com/crops/silage_making.cfm

Sipilä, A. & Saarisalo, E. 2006. Rehun säilöntä. Suomen nurmiyhdistyksen ja MTT:n julkaisu. Viitattu 6.3.2011. https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/nurmiyhdistys/Nurmitieto/sisallysluettelo/311_rehunsailonta.pdf

St1, 2010. Viitattu 25.9.2011. <http://www.st1.fi/>

Työ- ja elinkeinoministeriö, Energiaosasto. 2010. Suomen kansallinen toimintasuunnitelma uusiutuvista lähteistä peräisin olevan energian edistämiseksi direktiivin 2009/28/EY mukaisesti. Viitattu 5.3.2010. http://www.tem.fi/files/27405/NREAP_300610_FINLAND.pdf

VTT vastaa E10 kysymyksiin. 2011. Viitattu 25.9.2011. http://www.vtt.fi/news/2011/topicals/01262011_e10.jsp

Walker, G.M. 2010. Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol. Ventus Publishing ApS. Viitattu 5.3.2011. Saatavilla Internetistä: <http://bookboon.com/fi/student/energy>

Esivalmisteluina toteutetaan:

1. Punnitse pullojen lukkojen (myös puhdistettu vesi tai glyseroli lukossa) sekä korkkien kanssa (15kpl pulloa, lukkoa ja korkkia).
2. Valmista sitruunahappopuskuri: 10,51g sitruunahappoa/1000ml pure vettä säädä pH5:ksi NaOH:lla.
3. Laimenna Celluclastia ja Novozymeä sitruunahappopuskuriin. Celluclastia tarvitaan 40,161ml ja Novozymeä 17,749ml. Sitruunahappopuskuria 2,09ml.
4. Näytettä punnitaan noin 110 g 500 ml:n pulloihin ja lisätään bufferia (sitruunahappopuskuri) noin 280 ml sekä puolet entsyymien määrästä (2ml entsyymilaimennosta/pullo). Taulukosta kuinka paljon näytettä ja bufferia.
5. Lämmitetään 50°C:een.
6. Annetaan vaikuttaa koko ajan sekoittaen noin 3 tuntia (inkubaattorissa)
7. Jäähdytetään välillä sekoittaen
8. (Laitetaan jääkaappiin odottamaan seuraavan päivän fermentointia)

					Ensimmäi- nen entsyymi- lisä:	Bufferia hiivan ja entsyymien laimennokse- en:	Toinen entsyymi- lisä:		Kokonai- s- tilavuus ml:
	Kuva- aine%	Näytet- tä g:	Bufferi- a ml:	Bufferi ja näyte:				Hiiv a:	
M0	17,841 3	112,36	275,64	388	2	7	2	1	400
MFA	18,915 1	105,82	282,18	388	2	7	2	1	400
MF	16,092 6	124,224	263,77 6	388	2	7	2	1	400

Fermentointi:

1. Maissi-bufferi-entsyymiseos lämmitetään 35°C:een.
2. Otetaan dekantterilasiin 7ml bufferia sekä lisätään hiivaa 1g. Lisätään vielä 2ml entsyymilaimennosta ja sekoitetaan.
3. Lisätään maissi-bufferi-entsyymiseokseen (fermentointipulloihin) hiiva-bufferi-entsyymiseosta, sekoitetaan, tyytetään, laitetaan korkit + lukot, punnitaan ja asetetaan inkubaattoriin.
4. Pullojen annetaan olla inkubaattorissa välillä punniten: 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 16h, 24h, 32h, 48h ja 72h.
5. Otetaan fermentoidusta näytteet
6. Pakastettiin rotavaporoointia varten.

SUUNNITELMA	2.5.2011	KÄYNNISTYS	4.5.2011
--------------------	----------	-------------------	----------

Ympäri on Paroisten jätevedenpuhdistamolta 2.5.2011 haettu ja näkkiinnytetty kaksi päivää

ANALYYSITULOSTEN POHJALTA:

NÄYTE	TS %	VS %	VS/TS
A: M0	17,80	16,30	0,92
B: MFA	18,90	17,70	0,94
C: MF	16,10	14,90	0,93
D: M0 etanolifermentoitu	5,89	5,07	0,86
E: MFA etanolifermentoitu	4,93	3,99	0,81
F: MF etanolifermentoitu	5,36	4,52	0,84
Ympäri	3,67	1,77	0,48

- ympäri näkkiinnytetty (36 C) kaksi päivää ja koe käynnistyy 4.5.2011

- tehdään ympästä TS,VS-analyysi maanantaina muiden näytteiden mukana, jota tulosta käytetään tuloslaskennassa

METAANITUOTTOMITTAUKSET

koepullojen kokonaistäyttöttilavuus = 400 g

Pullo		Ympäri g	Näyte, g	Vesi
VESIHAUDE 1:				
1	Ympäri	290		110,0
2	Ympäri	290		110,0
3	Ympäri	290		110,0
4	M0	290	25,2	84,8
5	M0	290	25,2	84,8
6	M0	290	25,2	84,8
7	M0	290	25,2	84,8
8	MFA	290	23,2	86,8
9	MFA	290	23,2	86,8
10	MFA	290	23,2	86,8
11	MFA	290	23,2	86,8
12	MF	290	27,6	82,4
13	MF	290	27,6	82,4
14	MF	290	27,6	82,4
15	MF	290	27,6	82,4
VESIHAUDE 2:				
16	Ympäri + sitruunahappo	290		110,0
17	Ympäri + sitruunahappo	290		110,0
18	Ympäri + sitruunahappo	290		110,0
				Vesi
19	M0 fermentoitu	290	81,0	29,0
20	M0 fermentoitu	290	81,0	29,0
21	M0 fermentoitu	290	81,0	29,0
22	M0 fermentoitu	290	81,0	29,0
23	MFA fermentoitu	290	102,9	7,1
24	MFA fermentoitu	290	102,9	7,1
25	MFA fermentoitu	290	102,9	7,1
26	MFA fermentoitu	290	102,9	7,1
27	MF fermentoitu	290	90,8	19,2
28	MF fermentoitu	290	90,8	19,2
29	MF fermentoitu	290	90,8	19,2
30	MF fermentoitu	290	90,8	19,2

Maissin yhdistetty bioetanoli- ja biokaasutuotanto

Liite 3

Metaanintuottotulokset

KUMULA TIVINEN näyte TUOTTO (keskiarvoNOLLA VÄHENNETTY), ML																			
	aika, vrk aloituksesta	0	1	2	3	4	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	30
	aika, tuntia aloituksesta	0	24	48	72	96	120	168	216	264	312	360	408	456	504	552	600	648	720
1	Ymppi	0,00	22,00	45,00	56,00	67,00	79,00	101,00	123,00	135,00	146,00	146,00	157,00	157,00	157,00	168,00	168,00	168,00	168,00
2	Ymppi	0,00	34,00	46,00	57,00	68,00	91,00	114,00	137,00	148,00	160,00	171,00	171,00	182,00	182,00	194,00	194,00	194,00	205,00
3	Ymppi	0,00	34,00	46,00	57,00	80,00	91,00	114,00	126,00	137,00	149,00	149,00	160,00	160,00	160,00	160,00	160,00	160,00	160,00
keskiarvo nolla:		0,00	30,00	45,67	56,67	71,67	87,00	109,67	128,67	140,00	151,67	155,33	162,67	166,33	166,33	174,00	174,00	174,00	177,67
4	M0	0,00	202,00	351,33	550,33	733,33	851,00	949,33	1029,33	1085,00	1139,33	1179,67	1216,33	1245,67	1278,67	1304,00	1326,00	1348,00	1377,33
5	M0	0,00	182,00	288,33	467,33	630,33	715,00	781,33	829,33	851,00	873,33	891,67	895,33	891,67	891,67	884,00	884,00	884,00	880,33
6	M0	0,00	207,00	371,33	586,33	751,33	860,00	961,33	1044,33	1100,00	1145,33	1197,67	1235,33	1265,67	1299,67	1326,00	1348,00	1371,00	1401,33
7	M0	0,00	206,00	358,33	571,33	747,33	856,00	967,33	1027,33	1090,00	1138,33	1179,67	1217,33	1247,67	1281,67	1307,00	1330,00	1352,00	1382,33
8	MFA	0,00	240,00	400,33	588,33	702,33	793,00	899,33	951,33	998,00	1045,33	1088,67	1128,33	1147,67	1182,67	1187,00	1211,00	1222,00	1230,33
9	MFA	0,00	236,00	382,33	556,33	668,33	746,00	861,33	923,33	970,00	1004,33	1058,67	1086,33	1117,67	1151,67	1179,00	1190,00	1202,00	1210,33
10	MFA	0,00	228,00	360,33	521,33	642,33	725,00	837,33	892,33	943,00	980,33	1013,67	1043,33	1063,67	1100,67	1118,00	1142,00	1167,00	1175,33
11	MFA	0,00	247,00	392,33	573,33	686,33	767,00	872,33	938,33	970,00	1000,33	1029,67	1064,33	1103,67	1135,67	1160,00	1192,00	1203,00	1220,33
12	MF	0,00	241,00	401,33	602,33	764,33	878,00	985,33	1060,33	1119,00	1166,33	1209,67	1249,33	1293,67	1328,67	1344,00	1368,20	1392,00	1399,33
13	MF	0,00	240,00	405,33	596,33	773,33	893,00	1005,33	1065,33	1122,00	1166,33	1218,67	1257,33	1298,67	1331,67	1347,00	1369,00	1392,00	1399,33
14	MF	0,00	238,00	386,33	596,33	756,33	869,00	963,33	1026,33	1073,00	1119,33	1174,67	1202,33	1244,67	1268,67	1284,00	1319,00	1330,00	1350,33
15	MF	0,00	250,00	407,33	623,33	791,33	916,00	1023,33	1090,33	1155,00	1207,33	1257,67	1293,33	1333,67	1365,67	1380,00	1401,00	1423,00	1440,33
35	M0 fermentoitu	0,00	227,16	427,06	599,65	865,86	1058,86	1210,20	1345,64	1465,42	1586,08	1658,31	1706,10	1745,43	1777,31	1793,98	1823,75	1834,75	1854,20
36	M0 fermentoitu	0,00	215,16	381,06	542,65	793,86	960,86	1108,20	1215,64	1318,42	1398,08	1439,31	1467,10	1486,43	1496,31	1501,98	1511,75	1511,75	1520,20
37	M0 fermentoitu	0,00	214,16	346,06	559,65	746,86	913,86	1094,20	1190,64	1293,42	1373,08	1425,31	1465,10	1483,43	1505,31	1521,98	1530,75	1542,75	1551,20
38	M0 fermentoitu	0,00	197,16	347,06	777,65	758,86	932,86	1087,20	1191,64	1291,42	1369,08	1409,31	1436,10	1454,43	1475,31	1480,98	1489,75	1489,75	1498,20
39	MFA fermentoitu	0,00	253,61	500,88	769,56	991,16	1162,40	1393,74	1574,43	1748,33	1865,13	1931,35	1971,25	2001,58	2023,35	2042,26	2050,79	2062,79	2083,36
40	MFA fermentoitu	0,00	241,61	463,88	720,56	929,16	1111,40	1318,74	1475,43	1649,33	1765,13	1842,35	1870,25	1901,58	1923,35	1941,26	1949,79	1961,79	1970,36
41	MFA fermentoitu	0,00	236,61	443,88	638,56	911,16	1080,40	1272,74	1425,43	1563,33	1654,13	1707,35	1735,25	1754,58	1775,35	1782,26	1790,79	1790,79	1799,36
42	MFA fermentoitu	0,00	225,61	444,88	659,56	830,16	1006,40	1267,74	1441,43	1596,33	1693,13	1760,35	1789,25	1821,58	1832,35	1839,26	1847,79	1859,79	1857,36
43	MF fermentoitu	0,00	201,07	397,77	651,83	852,66	1024,62	1218,96	1341,40	1457,64	1538,84	1593,03	1621,27	1629,60	1650,03	1657,66	1654,50	1665,50	1663,41
44	MF fermentoitu	0,00	218,07	431,77	675,83	838,66	989,62	1153,96	1255,40	1339,64	1410,84	1466,03	1483,27	1502,60	1525,03	1531,66	1540,50	1552,50	1550,41
45	MF fermentoitu	0,00	189,07	439,77	623,83	856,66	1004,62	1174,96	1284,40	1377,64	1469,84	1523,03	1551,27	1581,60	1603,03	1609,66	1617,50	1629,50	1638,41
46	MF fermentoitu	0,00	208,07	401,77	623,83	798,66	959,62	1121,96	1205,40	1293,64	1358,84	1404,03	1423,27	1443,60	1467,03	1474,66	1484,50	1484,50	1494,41

